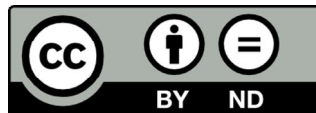




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Especiació en plantes de muntanya: una aproximació biosistemàtica als papers de la hibridació i l'aïllament geogràfic

Gemma Mas de Xaxars Giner



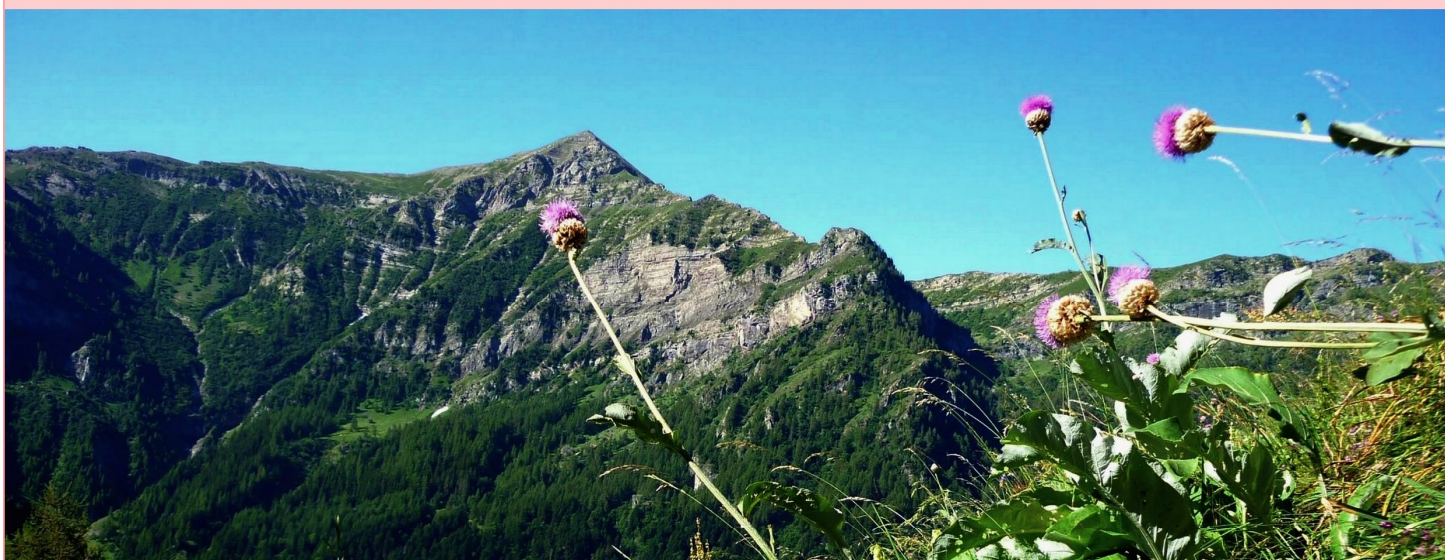
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- SenseObraDerivada 3.0.
Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - SinObraDerivada 3.0.
España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NoDerivatives 3.0.
Spain License.**

Especiació en plantes de muntanya: una aproximació biosistemàtica als papers de la hibridació i l'aïllament geogràfic

Gemma Mas de Xaxars Giner



**Tesi doctoral
Barcelona 2015**

**Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Laboratori de Botànica**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



**institut
botànic**

Centre mixt



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia

Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia.

Laboratori de Botànica – Unitat Associada al CSIC

Programa de doctorat: Biodiversitat, 2010-2015

INSTITUT BOTÀNIC DE BARCELONA (IBB-CSIC-ICUB)

**Especiació en plantes de muntanya: una aproximació biosistemàtica
als papers de la hibridació i l'aïllament geogràfic.**

Memòria presentada per Gemma Mas de Xaxars Giner per a optar al títol de doctora per la
Universitat de Barcelona.

Amb el vist-i-plau dels directors de tesi:

Dr. Joan Vallès Xirau

Dra. M. Teresa Garnatje Roca

Gemma Mas de Xaxars Giner

Barcelona, 2015

Aquesta tesi doctoral ha estat desenvolupada amb el suport d'una beca predoctoral ADR de la Universitat de Barcelona. El finançament econòmic de la recerca ha anat a càrrec dels projectes del *Ministerio de Ciencia e Innovación* (CGL2010-22234-C02/BOS) i del *Ministerio de Economía y Competitividad* (CGL2013-49097-C2-2-P), així com del suport de la Generalitat de Catalunya a Grups de Recerca de Catalunya: 2009/SGR/00439, 2014/SGR/00514 i de l'Institut d'Estudis Catalans amb el projecte *Relacions citogenètiques i filogenètiques entre diverses espècies de Saxifraga dels Pirineus i del Montseny*.

“Scientists have calculated that the chances of something so patently absurd actually existing are millions to one. But magicians have calculated that million-to-one chances crop up nine times out of ten.”

— Terry Pratchett

ÍNDEX

PREFACI	3
INTRODUCCIÓ	7
Dels inicis de la taxonomia a la formulació de la teoria de l'evolució	7
El problema del concepte d'espècie	9
La importància de desenvolupar conceptes per al creixement del pensament biològic	10
Aïllament reproductiu i modes d'especiació	12
Reformulació del paper de la hibridació i la introgressió en la generació de noves espècies	13
L'estudi de les quantitats de DNA	15
El paper dels canvis cromosòmics en l'especiació vegetal	17
Els hàbitats de muntanya a la regió mediterrània: del messinià a l'actualitat passant per les glaciacions del quaternari	20
Els grups de plantes d'estudi	21
OBJECTIUS	23
INFORME DELS DIRECTORS	25
DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS OBTINGUTS	29
Hibridació i aïllament en el grup d'espècies dels Pirineus i de les muntanyes Catalanídiques del gènere <i>Saxifraga</i> , subsecció <i>Triplinervium</i> (<i>Saxifragaceae</i>)	29
Caracterització de l'híbrid <i>Jacobaea × mirabilis</i> (<i>Asteraceae</i>)	32
Hibridació en les espècies alpines del gènere <i>Rhaponticum</i> (<i>Asteraceae</i>)	33

Disploïdia i poliploïdia en vicariància en la diversificació de les espècies del gènere <i>Artemisia</i> (Asteraceae) de l'alta muntanya europea	36
Consideracions finals	39
CONCLUSIONS	41
BIBLIOGRAFIA	45
COMPENDI DE PUBLICACIONS	55
Phylogenetic and cytogenetic studies reveal hybrid speciation in <i>Saxifraga</i> subsect. <i>Triplinervium</i> (Saxifragaceae)	57
Relacions entre diverses espècies de <i>Saxifraga</i> dels Pirineus i de les muntanyes Catalanídiques	73
Molecular and cytogenetic confirmation of the hybrid origin of <i>Jacobaea</i> × <i>mirabilis</i> (Asteraceae, Senecioneae), with nomenclatura notes on this name	87
The outcomes of hybridization in alpine <i>Rhaponticum</i> (Asteraceae, Cardueae)	99
Impact of dysploidy and polyploidy on the diversification of high mountain <i>Artemisia</i> (Asteraceae) and allies	137

PREFACI

Nothing in biology makes sense except in the light of evolution

Dobzhansky (1973)

Abans de començar voldria permetre'm una llicència (o bé donar un avís): la tesi que ara teniu a les mans no és la "típica" tesi biosistemàtica. Hi haurà qui trobarà que la introducció d'aquest manuscrit és massa "filosòfica", i potser és així. És per això que no començaré directament amb els "típics" agraïments, sinó explicant en primer lloc què m'ha dut a aquesta mena d'enfocament.

La història evolutiva de qualsevol grup d'organismes (o seqüències de DNA) es proposa mitjançant una inferència i, per sentit comú, la reconstrucció més probable és la que sol considerar-se més plausible. Però les coses improbables, especialment en biologia, amb el temps passen, i solen ser les que donen lloc als canvis evolutius més importants. La vida mateixa en el nostre planeta neix d'una conjunció de fets altament improbables, tant que segurament només han tingut lloc una vegada i encara no s'ha pogut desxifrar del tot els misteris del seu origen.

La interpretació d'una història evolutiva, però, no es basa només en una probabilitat, sinó que ha de tenir "sentit biològic", i aquest és el que intenten trobar els investigadors que fan la interpretació, que està condicionada pels seus coneixements i la seva experiència prèvia. És per això que he volgut començar la introducció d'aquesta tesi amb una síntesi de com ha anat creixent el coneixement biològic des dels inicis de la humanitat fins a Darwin, perquè el descobriment de l'evolució, com tota revolució ideològica, neix d'una forma diferent de pensar.

El següent punt que he cregut convenient de tractar és el concepte d'espècie i la importància del desenvolupament de conceptes en el pensament biològic. Essent una tesi sobre especiació en plantes on la hibridació n'és una part molt important, calia introduir el concepte d'espècie, la seva problemàtica i com el pensament zoològic ha influït, molt més que no pas el botànic, en la manera d'interpretar el paper evolutiu de la hibridació.

Tot seguit ja entro en temes més directament relacionats amb la tesi, com és una síntesi sobre l'aïllament reproductiu, els modes d'especiació i l'estudi de la hibridació i la introgressió en plantes. Després s'introdueixen les aplicacions de la cariologia en l'estudi de la diversificació en plantes (principalment les mesures de quantitat de DNA nuclear i els canvis en els nombres cromosòmics). Aquests apartats constitueixen el marc conceptual de la tesi. Finalment es presenten els hàbitats de muntanya de la regió mediterrània (el marc geogràfic dels estudis que hem fet), els canvis que han anat patint amb el temps (el marc temporal) i els grups de plantes que s'han estudiat.

No obstant, si bé els marcs geogràfic i temporal són clars, el conceptual no sempre ho és, perquè els conceptes sovint es redefeixen amb el temps o n'apareixen de nous com a resposta a la necessitat d'explicar la realitat a mesura que augmenta el coneixement. És per això que crec que, de la mateixa manera que la biologia no té sentit si no s'interpreta des de l'evolució, l'evolució tampoc no té sentit si no s'analitza què creus saber, per què creus saber-ho i si no tens prou capacitat d'observació per a veure més enllà de la norma -perquè a vegades les normes no es compleixen, en biologia-, i deduir per observació el que els altres no eren capaços de veure, és el que va fer gran Darwin.

Un cop presentada la tesi, m'agradaria dedicar un agraïment a totes aquelles persones que l'han fet possible. El primer cop que vaig sentir la frase de Dobzhansky amb què comença el prefaci va ser en el curs d'Evolució, de boca del Dr. Antonio Fontdevila, quan cursava la llicenciatura en Biologia a la Universitat Autònoma de Barcelona. I, si bé llavors no vaig acabar de copsar la clarividència i la genialitat de Dobzhansky, aquell curs per a mi va ser com "veure la llum", va despertar la meua curiositat científica i em va fer perdre la por a la Genètica, una disciplina que fins aquell moment em resultava difícil i que de cop cobrava sentit sota la llum de l'Evolució. Vull agrair també al Dr. Fontdevila i a les seves col·laboradores, la Dra. Pilar García-Guerreiro i la Montse Peiró, l'haver-me acollit com a estudiant en pràctiques al seu laboratori i haver-me guiat i ensenyat en la meua primera activitat veritablement investigadora. D'aquest període de llicenciatura, també vull dedicar un agraïment especial a dos companys, l'Álex i l'Òscar, per haver-me animat a ficar-me al món de la investigació quan jo no veia clar que hi servís.

I així, per una mescla podríem dir d'atzar i selecció vaig arribar a la Universitat de Barcelona com a estudiant de màster amb moltes ganes de seguir aprenent. D'aquesta etapa vull agrair a les doctores Carmen Segarra i Montserrat Papaceit la dedicació i la formació que

em van brindar, així com al Juanma i l'Irepan, els meus companys de laboratori durant el projecte de màster, les estones compartides i la meticulositat que em van aportar. També vull agrair al Dr. Xavier de la Cruz i al seus col·laboradors, en especial al Jordi i a la Montse, haver-me permès formar part del seu equip durant un temps i els coneixements bioinformàtics que vaig adquirir, que, de ben segur, em seran de gran utilitat en aquest nou període que ara tot just inicio en dipositar la tesi.

Aquesta tesi, lògicament, no hauria estat possible si no hagués conegut els meus directors, el Dr. Joan Vallès i la Dra. Teresa Garnatje. I en aquest punt vull agrair a la Dra. Mercè Bernal una trucada providencial (un cop més, l'atzar) i una recomanació que em va portar a conèixer el Joan. La veritat és que sé com dir què han significat en Joan i la Teresa per a mi (i espero que aquí no em censurin gaire en revisar el manuscrit). A part de tota la formació que m'han donat, senzillament, els admiro; són un model de treball i dedicació: sempre disponibles per a ajudar o dialogar encara que vagin ofegats de feina. Són les persones que realment un voldria al seu equip, perquè saps que si flaques no et deixaran enrere, t'ajudaran a creuar la meta encara que això els alenteixi. Agraïxo molt tot el que han fet per mi, però, sobretot, el que agraïxo més és l'espai que m'han donat per a poder escriure la tesi en què jo creia, les eines que m'han donat per a pensar per mi mateixa i els debats argumentals que hem mantingut, que m'han permès créixer i millorar substancialment aquest manuscrit.

Vull agrair també a tota la gent del Laboratori de Botànica de la Facultat de Farmàcia de la UB, del Centre de Documentació de Biodiversitat Vegetal de la UB (CeDocBiV-CRAI) i de l'Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB) la seva amabilitat i l'haver-me fet sentit com a casa. Particularment, vull dedicar un agraïment a unes persones que han estat especials per a mi. A la Sònia, que a més d'haver estat una col·laboradora essencial per a acabar aquesta tesi, ha estat també una molt bona amiga. A l'Oriane, per haver compartit amb mi la seva fascinació per la ciència. Al Dani, per estar sempre disponible per a ajudar. A l'Alfredo, per l'empenta que em va donar per a escriure el meu primer treball, així com també a l'Arnau Mercadé, l'Ismael Sánchez, en Pablo Vargas i en Pere Barnola per la seva ajuda i comentaris en aquest treball. A l'Airy, l'Àlex, la Carmen, la Ginesta, la Joana, la Sadia, la Sara i l'Ugo pel suport moral i les bones estones compartides. A en Joan Martín, per les nostres converses sobre el "temps cíclic". Finalment, un agraïment molt particular a en Josep Vigo pel seu bon judici i assessorament en temes botànics... i en qüestions de moda.

També tinc molt presents totes aquelles persones que han estat prop de mi abans de la tesi i durant el seu desenvolupament i que sé que seguiran sent-hi després, i vull dedicar-los també un agraïment. Als meus amics: l'Andrea, la Cris, la Paula, l'Agus, el Jaume, el Josep M., el Kuko, la Maria, la Marina i la Sara. Per estar sempre per mi i fer-me sentir millor del que sóc en realitat. Als meus pares, per tot el suport que m'han donat des de sempre i per haver-me donat la llibertat de triar el que més m'agradava, encara que no ho acabessin d'entendre. Al Jose, per estimar-me com si també fos la seva filla. A la Laia, per ser la meva germana-amiga i companya de viatges. A l'Albert i l'Ester, per ser part de la meva *ohana* i l'esperança que aquesta augmenti aviat. I, finalment, a les tietes i en especial a la meva iaia, per haver intentat adaptar-se a un món que ha canviat i haver-se esforçat per entendre que el que li havien ensenyat que era el correcte no té perquè ser bo, i això és evolució.

INTRODUCCIÓ

Dels inicis de la taxonomia a la formulació de la teoria de l'evolució

L'estudi de la diversitat biològica és una activitat que pot considerar-se tan antiga com la mateixa humanitat (Magner, 2002). Els humans som grans observadors de patrons de repetició i com a resposta concebem categories. De fet, el gran desenvolupament de la ment humana sembla estar estretament relacionat amb la percepció de discontinuïtats en la natura (Raven et al., 1971). Les observacions recurrents d'animals i plantes de l'entorn propiciaren la seva assignació a categories per tal d'ordenar les nostres idees sobre la diversitat d'organismes i reflectir-les en el llenguatge (Hey, 2001). Per als primers humans, el coneixement de les propietats de les plantes, dels animals i dels seus productes era vital per incrementar la seva probabilitat de supervivència (Magner, 2002) i per a comunicar aquesta informació als altres membres de la família o del grup calia conèixer-los i disposar de noms per a referir-s'hi. La taxonomia, la ciència de la classificació, és, doncs, una de les primeres disciplines científiques, encara que la paraula "taxonomia" dati del segle XIX (Rouhan & Gaudeul, 2014) i que el que realment s'usa fora de l'àmbit científic són les taxonomies populars –aquelles que s'han generat en les comunitats humanes segons les seves necessitats (Berlin, 1992).

Si bé es coneixen estudiosos de les ciències naturals en les antigues cultures de Mesopotàmia, Egipte, el subcontinent indi i la Xina, entre d'altres, les arrels de la biologia, així com les bases del pensament científic modern, s'atribueixen a l'antiga filosofia grega. Va ser cap al segle VI abans de Crist quan els filòsofs grecs van començar a formular noves explicacions sobre com s'havien arribat a formar i a organitzar el món i la humanitat. Aquestes qüestions eren molt antigues però els filòsofs grecs les van treure dels camps de la religió i la mitologia per a posar-les dins del domini ara ocupat per la ciència i la filosofia (Magner, 2002). La fita més important dels grecs, però, va ser associar la cerca de respostes a la capacitat d'abstracció i al desenvolupament del mètode científic, que ha perdurat fins als nostres dies (Jahn et al., 1989).

En el camp de la taxonomia botànica, Teofrast (371-286 aC), deixeble d'Aristòtil, és considerat el primer d'una llarga llista d'homes que han lluitat per trobar un ordre, que ells creien que havia d'existir, en la desbordant varietat del món natural (Pavord, 2005). En la seva

obra *Historia plantarum*, considerada el primer treball científic botànic de l'antiguitat, classificà al voltant de 500 plantes alhora que desenvolupà la terminologia per a descriure-les.

No obstant, la qüestió de com s'originen les espècies no va ser un problema científic abans del segle XVIII, quan es va prendre consciència de la gran diversitat existent i es va començar a plantejar el que avui en dia coneixem com evolució biològica. L'obstacle més gran per a l'establiment d'una teoria de l'evolució és que l'evolució no es pot observar directament com un fenomen físic, només pot inferir-se. Es pot dir fins i tot que l'evolució contradiu el sentit comú, ja que, des de la nostra percepció la descendència de qualsevol organisme sempre se li assembla. Així doncs calia tenir el marc conceptual apropiat i erosionar les creences preexistents, en especial dues: en primer lloc la creença que l'univers ha estat dissenyat en cada detall per un creador intel·ligent, i en segon lloc que el món és estàtic (no canviant) i de curta durada. Les primeres històries sobre l'origen del món tenen en comú que la creació és un esdeveniment únic i per a tot el temps. El concepte d'espècie tradicional es remunta fins a l'*eidōs* (εἶδος) i l'essencialisme de Plató. Per a l'essencialista, cada espècie es defineix per un tipus o essència (l'*eidōs*), dividint la natura doncs en unitats discontinues (les espècies) aïllades les unes de les altres. Aquesta visió va estendre's per tot el món occidental amb el cristianisme, imposant-se la manera fixista de veure les espècies i generant la necessitat de voler comprendre l'*Scala naturae*: Déu havia creat les espècies amb un ordre i un propòsit i la feina dels estudiosos de la biodiversitat era entendre quin era aquest propòsit per a cada espècie. Cada espècie a més era una obra acabada amb la seva pròpia essència i que, per tant, no podia canviar o evolucionar (Mayr, 1982). Va costar molts segles trencar aquest dogma el qual, de fet, encara es manté en algunes comunitats actuals.

Tornant, però, a la formulació de la teoria de l'evolució, aquesta deu molt al treball minuciós de molts naturalistes i anatomistes del segle XVIII. L'increment constant del nombre d'espècies conegudes feia cada vegada més difícil la seva ordenació en una escala natural. Carl von Linné (1707-1778) va proposar una classificació sistemàtica per tal de reflectir aquest ordre. Alhora, va implantar amb èxit el sistema de nomenclatura binomial per a poder anomenar fàcilment les espècies que han arribat fins els nostres dies. La seva idea era que fos memoritzable si més no a nivell de gènere (per això proposà una nomenclatura senzilla), i va arribar a presentar diagnosis de 1336 gèneres a la seva obra *Genera Plantarum* (1737) i els seus suplementos. Segurament no sospitava les desenes de milers de gèneres que estaven per descobrir (Raven et al., 1971). Les grans expedicions científiques del segle XVIII a tots els continents van estimular també el desenvolupament del concepte d'adaptació de cada espècie

a una determinada regió geogràfica (Fontdevila & Moya, 2003), i va ser durant una d'aquestes expedicions, a bord del *Beagle* (Darwin, 1839), on Darwin va realitzar les observacions que el van conduir a canviar el pensament de tot el món.

El problema del concepte d'espècie

Amb l'acceptació de que les espècies evolucionen va néixer un nou debat sobre el que encara no hi ha quòrum avui dia: què són les espècies? Són quelcom real o bé construccions arbitràries fetes per l'home? Aquest debat sembla més filosòfic que científic, però no es poden estudiar (bé) les espècies sense determinar què són. Històricament hi havia congruència entre filòsofs i biòlegs; les espècies es veien d'una forma essencialista: uniformes, fixes i que no havien canviat des de la seva creació divina (Chambers, 2012). Però les espècies varien, i amb la variació poden donar lloc a noves espècies. Quantificar i establir quanta variació genètica cal per a que tingui lloc el procés d'especiació va esdevenir una preocupació cabdal durant dècades. El debat sobre les espècies, però, té lloc principalment entre taxonomistes, que defineixen les espècies a partir d'un tipus morfològic (l'*eidos* de Plató) i els defensors de les espècies biològiques, que les defineixen com a unitats reproductivament aïllades les unes de les altres (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942). Cal tenir en compte, però, que, si bé els organismes són unitats discretes, les espècies, així com l'evolució, són dinàmiques i per això qualsevol definició d'espècie, encara que presenti certa plasticitat, tindrà crítiques i no serà sempre aplicable. En la nostra forma de pensar i el nostre llenguatge, les espècies són les categories que som capaços de distingir, els noms que es donen a organismes extremadament similars (Margulis & Sagan, 2002). Els grups evolutius, en canvi, existeixen malgrat que no siguem capaços de reconèixer-los, siguin o no diferents (Hey, 2001). El problema de les espècies està, doncs, causat perquè s'anomena 'espècie' dues menes de coses (Chambers, 2012) i aquestes dues maneres de definir-les sovint entren en conflicte: organismes morfològicament molt semblants poden pertànyer a grups reproductius diferents. Això ha conduït a la situació que molts biòlegs evolutius (p. ex. Mayr, 1996) no considerin el grau de diferenciació morfològica com a una definició adequada d'espècie i l'ignorin. Però les espècies són ambdues coses: entitats que podem distingir (i materialitzar en tàxons) i grups evolutius; i de moment encara no existeix una redefinició del concepte d'espècie que pugui unificar ambdues concepcions (Hey, 2001), malgrat tots els intents que s'han realitzat fins a l'actualitat.

Segurament el punt més delicat amb el qual s'ha d'enfrontar qualsevol concepte d'espècie és la hibridació. Que les espècies poden hibridar és quelcom que és coneix com a mínim des de l'època de Linné (Grant, 1971; Arnold, 2006). Darwin hi dedica un capítol de l'*Origen de les espècies* (1859), que anomena *Hibridisme* i que comença amb la següent afirmació: "L'opinió que generalment sostenen els naturalistes és que les espècies, quan s'encreuen, s'han dotat especialment de l'atribut de l'esterilitat per tal d'evitar la confusió de totes les formes orgàniques". A Darwin, aquesta opinió li sembla probable d'entrada, ja que les espècies d'un mateix territori no podrien mantenir-se diferents si fossin capaces de creuar-se lliurement, però no creu que l'esterilitat sigui un atribut que s'adquireixi d'un manera especial, sinó que és fortuïta. Alguns dels científics (filòsofs o naturalistes) que l'havien precedit, com ara Buffon o Kant, usaven el criteri de l'esterilitat en la progènie per tal de diferenciar i separar espècies (Grant, 1971). El concepte biològic d'espècie (Mayr, 1942) defineix les espècies com a "grups de poblacions naturals d'encreuament real o potencial, els quals estan reproductivament aïllats d'altres grups". Sota aquest criteri, doncs, és impossible per definició que dues espècies puguin hibridar i donar lloc a descendència fèrtil (Arnold, 2006), i els conceptes que generen confusió s'han de reformular per tal de reflectir la realitat biològica.

La importància de desenvolupar conceptes per al creixement del pensament biològic

La creença que sol tenir la gent en general és que el progrés té lloc amb nous descobriments o invencions, però la comprensió del món s'assoleix més efectivament amb millores conceptuals que pel descobriment de nous factors. I això és el progrés científic: el desenvolupament de nous conceptes i el repetit afinament de les definicions que s'articulen a aquests conceptes. La història de la biologia està plena d'exemples de conceptes les definicions dels quals s'han hagut de modificar repetidament a mesura que creixia el seu coneixement i comprensió (Mayr, 1982). Potser el més significatiu i controvertit és l'esmentat sobre el concepte d'espècie, per al qual hi ha més de 20 definicions, i cap de lliure de crítiques. Moltes de les cèlebres controvèrsies de la història de la ciència s'han originat a partir de faltes de comprensió, senzillament perquè els oponents es referien a conceptes molt diferents amb el mateix terme. La manca de vocabulari tècnic en diferents moments de la història, com ara a l'antiga Grècia, també ha originat problemes semàntics i traduccions errònies que, desafortunadament, han influït en la nostra comprensió del pensament d'alguns filòsofs, com ara Aristòtil (Mayr, 1982).

Per això a vegades només la simple introducció d'un nou terme ajuda enormement a clarificar situacions prèvies que eren conceptualment confoses.

El fet de considerar la biologia com una ciència menor i voler reduir-la a processos físics o voler-ne trobar lleis universals també ha condicionat molt el seu desenvolupament (Dobzhansky, 1974). La tendència des de fa unes dècades és que les generalitzacions en biologia són gairebé invariablement de natura probabilística. Així, Mayr (1982) formula que només hi ha una llei universal en biologia i és que “totes les lleis biològiques tenen excepcions”. Sigui com sigui, aquesta adopció pràcticament universal d'interpretar la veritat científica com una probabilitat, si bé s'ajusta més a la realitat biològica, presenta també els seus contres. Tal com va exposar Wilson (2013), per la qual cosa va rebre una allau de crítiques (principalment de joves investigadors), no cal ser un bon matemàtic per a ser un bon científic: els pioners en la ciència rarament fan descobriments extraient idees a partir de les matemàtiques pures. És més, una teoria matemàticament correcta pot donar lloc fàcilment a resultats fantàstics que poden impactar en la nostra forma de pensar generant noves idees errònies. Així doncs, s'ha anat acceptant també que de moltes conclusions en biologia no és possible subministrar-ne demostracions o proves matemàtiques completes.

Per altra banda, ningú viu en el buit; qualsevol persona que llegeixi amb avidesa està destinada a ser influïda per les seves lectures. Un exemple és el mateix Darwin quan va tornar del seu viatge en el *Beagle* (Schweber, 1977). La majoria dels científics, no obstant, desconeixen el seu propi marc d'idees. És a dir, rarament expressen amb claredat –si és que hi pensen– quines veritats o conceptes accepten sense qüestionar-les i quines altres rebutgen totalment. Ningú està lliure del que en psicologia s'anomenen assumpcions silents i que condicionen les prioritats i els sistemes de valors, els quals al seu torn determinen coses com ara la direcció d'una nova recerca o bé quines teories s'està més ansiós per confirmar o refutar (Mayr, 1982). En paraules del filòsof de la ciència Daniel Dennett (1995): “No hi ha tal cosa com la ciència lliure de filosofia; només hi ha ciència els antecedents filosòfics de la qual s'accepten sense ser examinats”.

El creixement del coneixement biològic també ha estat frenat per assumpcions de cada època, les quals sovint venien de grans pensadors, com ara Plató, que, amb l'essencialisme i el seu èmfasi en la discontinuïtat, la constància i els valors típics, ha dominat la forma de pensar del món occidental durant segles. O bé el dogma cristià, amb la filosofia de Descartes, o el fixisme, que van defensar ferventment Linné i Cuvier entre d'altres malgrat tenir davant d'ells

evidències de l'evolució. La revolució darwiniana assenyalava l'emancipació de la ciència de la religió (i, per a alguns, també de la filosofia tot i que, d'aquesta darrera afirmació se n'ha discrepat).

La biologia actual, en especial l'evolutiva, tampoc no està exempta, però, de dogmes, que són les assumpcions silents de molts investigadors. Tal com discuteix Arnold (1997 i 2006), molts biòlegs evolutius atribueixen un rol negatiu a l'intercanvi genètic (principalment al que es produeix per hibridació i/o introgressió). Tots els conceptes d'espècies es basen en el punt de vista que el procés d'hibridació natural és quelcom “dolent” (Arnold, 1997). Va ser sobretot en el curs del desenvolupament del concepte biològic d'espècie que va imposar-se una mena de repugnància contra la hibridació (Mallet, 2005), ja que és vista com un “trencament dels mecanismes d'aïllament” (Mayr, 1963). Aquesta visió negativa també té a veure amb aspectes sociològics i filosòfics: ‘pur’ és una paraula aprovativa i ‘híbrid’ una de pejorativa (Patterson, 1985). Malgrat les evidències que estaven trobant botànics com Anderson & Stebbins (1954) que l'intercanvi genètic era quelcom generalitzat en les plantes i tenia importància en la seva diversificació i adaptació, el dogma que la diversificació evolutiva i les espècies sorgeixen quasi exclusivament en al·lopatría (és a dir, en absència de flux gènic) va quedar ben establert al final del període de la síntesi moderna (c. 1950) en especial pels escrits de Mayr i Dobzhansky (Arnold, 2006), els quals, tot s'ha de dir, eren zoològs. Aquest dogma i el de l'esterilitat dels híbrids, provinents de la zoologia i, sobretot del món dels grans mamífers (el cas de la mula és el més conegut per tothom), es van adoptar com un fet en les següents dècades malgrat que es coneixien en plantes molts exemples d'híbrids, fins i tot intergenèrics, perfectament fèrtils. Això va tenir (i continua tenint) un efecte en el disseny dels experiments i en les conclusions a les quals s'arriba (Arnold, 2006).

Aïllament reproductiu i modes d'especiació

A partir de l'observació directa de la natura es pot apreciar que els organismes no formen un continuïum, sinó que es divideixen en sèries de grups més o menys discrets d'individus que s'encreuen (Grant, 1971). Dobzhansky (1937) va ser dels primers a aprofundir en el concepte d'aïllament reproductiu com la causa principal que origina i manté la cohesió de les espècies; el simple fet que existeixin aquests grups discrets de qualsevol mida constitueix una evidència que alguns mecanismes prevenen el seu encreuament i que, per tant, els estan aïllant. El problema principal de l'especiació rau a entendre l'origen de les barreres reproductives que

realment o potencialment estan prevenint l'intercanvi genètic (Coyne & Allen, 2004), és a dir, veure quines barreres han actuat inicialment i en quin context s'han produït.

Simplificant una mica, l'especiació pot tenir lloc en dos contextos: amb aïllament geogràfic (especiació al·lopàtrica) o sense aïllament geogràfic (especiació simpàtrica).

La teoria sobre l'especiació al·lopàtrica pressuposa que, donat el temps suficient, és probable que qualsevol parella de tàxons aïllats desenvolupin barreres reproductives (Coyne & Allen, 2004). En paraules de Fontdevila & Moya (2003): "l'al·lopatria impedeix el flux gènic i aïlla la població, que divergeix cap a una nova espècie". Malgrat que això s'assumeix com a quelcom totalment plausible, aquesta descripció només implica un canvi de les freqüències gèniques entre poblacions i la variació intraespecífica només per si mateixa no condueix a la formació de noves espècies (Margulis & Sagan, 2002). Per contra, l'especiació simpàtrica sempre ha estat qüestionada, sent per molts difícil de concebre com pot generar-se diferenciació dins d'una mateixa població sense barreres geogràfiques (Grant, 1971). Els models per especiació simpàtrica, si bé són teòricament possibles, requereixen que es donin certes condicions ecològiques que fan que en molts casos encara siguin vistos com a poc probables (Coyne & Allen, 2004).

Aquesta manera preponderant de veure l'especiació com a procés al·lopàtric vicariant ha conduït a representar en forma d'arbre les relacions filogenètiques entre les espècies. En les darreres dècades, però, s'ha anat acceptant que la noció de "l'arbre de la vida" és totalment errònia i que la metàfora que millor descriu l'evolució és una xarxa complexa (Arnold & Larson, 2004), però no només a la base de l'arbre (en el seu origen), sinó en tot el seu conjunt. La divergència amb intercanvi genètic és el procés que té lloc de forma més comuna a la natura; les poblacions poden divergir en flux gènic continu o bé alternant períodes d'aïllament i períodes de contacte i d'intercanvi genètic (Fitzpatrick et al., 2008). Diversos autors han suggerit que s'hauria d'abandonar la classificació geogràfica dels modes d'especiació (p. ex. Via, 2001; Kirkpatrick & Ravigné, 2002), atès que representen escenaris biogeogràfics, però no genètics (i sovint tampoc temporals).

Reformulació del paper de la hibridació i la introgressió en la generació de noves espècies

En l'actualitat, s'ha acabat acceptant que la hibridació és un fenomen molt estès entre les espècies vegetals, però els seus efectes principals han estat i són encara molt debatuts, en

especial en animals on encara és sovint considerada rara i antinatural (Mallet, 2005). L'opinió general de molts naturalistes és que els híbrids presenten menor fertilitat/viabilitat que les seves espècies parentals. Darwin (1859) en el capítol sobre *Hibridisme*, basant-se en els resultats obtinguts per Herbert, Gärtner i Kölreuter en diferents experiments d'encreuaments amb plantes, ja diferencia entre l'esterilitat de les espècies en un primer encreuament (F_1) i l'esterilitat dels híbrids produïts d'aquest (F_2), i arriba a les següents conclusions: "Els primers encreuaments entre formes suficientment diferents per ser considerades espècies i els seus híbrids [retroencreuaments] són generalment, però no universalment, estèrils. L'esterilitat pot ser de diferents graus (...), varia de forma innata en els individus de la mateixa espècie i és susceptible a condicions favorables i desfavorables. El grau d'esterilitat no segueix estrictament una afinitat sistemàtica, però és governat per algunes lleis curioses i complexes". Tot seguit passa a especular sobre com la selecció natural podria provocar les barreres d'esterilitat en els híbrids, però, sàviament, abandona aquestes qüestions massa complexes de respondre desconeixent les lleis de l'herència.

Els estudis moderns sobre el paper de la hibridació estan influïts sobretot per l'obra d'Stebbins (1950, 1959, 1971). Stebbins (1959) defineix la hibridació com "l'encreuament entre individus pertanyents a poblacions separades les quals tenen diferents normes adaptatives". Amb això fa referència a poblacions que han estat aïllades espacialment i que han patit diferents pressions selectives, tot evitant el problema de definir l'espècie en parlar de poblacions i veient la hibridació essencialment com a un cas especial de recombinació gènica, és a dir, donant-li un rol creador de diversitat en contraposició a la visió de "via morta" que se'n solia tenir. Els treballs d'Stebbins sobre hibridació en part van estar inspirats pels estudis d'Anderson (1949) sobre la importància de la introgressió en les poblacions naturals. Un híbrid F_1 que no sigui del tot estèril pot retroencreuar-se amb les seves espècies parentals. Aquest procés és el que es va anomenar "hibridació introgressiva", és a dir, la transferència de material genètic entre tàxons que hibriden a través de retroencreuaments (Anderson & Hubricht, 1938). El primer pas, doncs, cap a la hibridació introgressiva és que es produeixin híbrids F_1 entre dues espècies (Arnold & Martin, 2009) i això a la natura sol donar-se en baixa freqüència per la presència de múltiples barreres reproductives (Arnold, 2006). Aquesta declaració, però, és tautològica perquè no seríem capaços de distingir les espècies si la hibridació fos comuna (Darwin, 1859; Mallet, 2005). La realitat és que la hibridació que té lloc de forma infreqüent i genera híbrids que en la seva gran majoria són inviàbles o estèrils, pot (i en nombrosos casos ho fa) acabar produint llinatges nous evolutivament estables (Arnold,

1997). El grau d'importància evolutiva de la hibridació no es pot predir, doncs, a partir de la seva freqüència, sinó que depèn de com s'estabilitzi l'híbrid en la població (Stebbins, 1959). La introgressió és una de les maneres en què la hibridació pot generar novetats evolutives (Anderson, 1949; Arnold, 2006), però la forma més coneguda i estudiada en plantes per la qual un híbrid interespecífic pot estabilitzar-se és multiplicant el seu nombre cromosòmic (Winge, 1917; Stebbins, 1950).

La hibridació entre poblacions amb diferents normes o adaptacions ecològiques pot presentar, doncs, tres tipus de resultats principals (Stebbins, 1980): i) enriquiment del patrimoni genètic d'una espècie, ii) producció de zones híbrides que esborrarien els límits d'espècies que abans podien diferenciar-se, i iii) especiació híbrida, tal i com la defineix Grant (1971): l'origen d'una espècie nova directament a partir d'un híbrid natural.

Sorprenentment, la primera persona que va proposar un model d'especiació per hibridació va ser Linné (Arnold, 1997), sense allunyar-se, però, del paradigma essencialista. Aquesta visió va ser vigorosament refusada pels seus contemporanis (p. ex. Kölreuter) i resulta grotesca per a alguns dels nostres contemporanis com ara Mayr (1982), que ho expressa amb les següents paraules: "Després que Linné va trobar tres o quatre híbrids naturals i els anomenà com a noves espècies, va ser posseït per la idea que totes les espècies s'havien originat per hibridació. En el curs de la dècada de 1760 i 1770, les seves opinions es van tornar progressivament més estrambòtiques i al final creia que Déu havia creat només els ordres de plantes i que tots els tàxons de categories inferiors a l'ordre, fins a l'espècie, havien resultat de mesclar-se"; és a dir, per hibridació. Aquesta visió de Linné, no obstant, resulta molt interessant i pionera, i apunta cap a dues de les tendències de pensament actual sobre l'especiació. La primera, que no és un procés dicotòmic, sinó que té lloc en xarxa, la qual cosa Stebbins (1980) ja havia constatat, atès que afirmava que a nivell de gènere i fins i tot de grups de gèneres els "arbres" evolutius dels vegetals poden assemblar-se a una xarxa de branques entrelaçades. I la segona, la gran importància que té l'intercanvi genètic (adquirir gens o genomes sencers) en la generació de noves espècies (Margulis & Sagan, 2002; Arnold, 2006).

L'estudi de les quantitats de DNA

La mida del genoma o quantitat de DNA nuclear és una característica pròpia de cada organisme. La dotació haploide d'un genoma es coneix com el seu valor C, on la C significa

constant (Swift, 1950), atès que es creia que era quelcom constant per a cada espècie. El seu valor s'estima a partir de la comparació amb alguns patrons de quantitat coneguda, per mètodes diversos entre els quals el de citometria en flux és, de lluny, el més usat actualment (Doležel et al., 2007; Pellicer & Leitch, 2014). La mida del genoma se sol estimar en cèl·lules somàtiques i per això se'n sol expressar el valor holoploide (2C) ja sigui en picograms o en megaparells de bases (Doležel et al., 2003). És un paràmetre que, lògicament, està molt relacionat amb el nivell de ploïdia i amb altres caràcters cariològics, com ara el nombre de cromosomes i la seva mida. Per això també és freqüent donar el valor monoploide (1Cx), que s'obté dividint el valor 2C pel nivell de ploïdia, per tal de poder establir comparacions entre dotacions haploides completes de cromosomes en casos de poliploïdia (Greilhuber et al., 2005). Aquesta mena de comparacions han revelat que, en les series poliploides, el valor 1Cx sol disminuir en augmentar el nivell de ploïdia, és a dir, que sol donar-se una pèrdua de DNA després d'una poliploïdització (fenomen que es coneix com a disminució de la mida del genoma) que podria tenir una considerable importància biològica (Leitch & Bennet, 2004). La mida del genoma també es correlaciona molt bé amb molts factors genotípics, així com també amb aspectes sistemàtics, evolutius i ecològics (Vallès & Garnatje, 2005; Bennett & Leitch, 2011).

Encara que en el si de cada espècie la mida del genoma és més o menys constant, existeix gran variació entre espècies. En plantes oscil·la des de $2C = 0.13$ pg de *Genlisea margaretae* Hutch. (Greilhuber et al., 2006) a $2C = 304.40$ pg de *Paris japonica* (Franch. & Sav.) Franch. (Pellicer et al., 2010). Fins i tot dins d'un mateix gènere la variació pot ser molt grossa, com ara en *Artemisia* (*Asteraceae*), un dels que s'ha estudiat en aquesta tesi doctoral, on el valor més alt és nou cops superior al més baix (Vallès et al., 2011). Aquesta variació pot ser deguda a múltiples factors. Les mutacions cromosòmiques, com guanys, pèrdues o reestructuracions de braços cromosòmics (i que poden acabar derivant en casos de dispoloïdia; vegeu el següent apartat) acostumen a tenir poc impacte en la mida del genoma (Dyer, 1979). Per contra, altres tipus de mutacions com ara les genòmiques (els canvis en el nombre total de cromosomes, principalment aneuploïdia i poliploïdia; Rieger et al., 1982) i que són molt freqüents en plantes, sí que solen generar canvis importants en la quantitat de DNA nuclear en el si de gèneres i, fins i tot, d'espècies. La mida del genoma també es pot veure molt afectada per dinàmiques d'expansió/contracció del genoma causades per activitats d'amplificació/inserció d'elements transposables (Hawkins et al., 2006).

Tot això fa que l'estudi de la mida del genoma sigui de gran interès, en especial perquè es pot determinar d'una forma relativament ràpida i senzilla per citometria de flux, tècnica que fins i tot permet establir nivells de ploïdia en materials d'herbari (Suda et al., 2006). Les mesures de quantitats de DNA situades en un marc filogenètic permeten inferir la tendència evolutiva d'un llinatge o entre llinatges (pujades i baixades: tendències a l'augment o a la reducció). Els canvis en la mida del genoma són rellevants, entre d'altres, en estudis sobre dos aspectes tractats en la present memòria: hibridació i plantes de muntanya. D'una banda, la quantitat de DNA nuclear ha estat un paràmetre força utilitzat en l'estudi d'híbrids com a eina per confirmar el seu origen, ja que en les F_1 és pràcticament igual a la mitjana exacta dels seus tàxons progenitors (Marques et al., 2012; Prančl et al., 2014, i referències que contenen), o bé és el doble si s'ha al·loploiditzat. D'altra banda, des que hi va començar a haver un conjunt de dades cariològiques suficient, s'havia conclòs que a latituds i altituds elevades hi predominaven genomes grossos, sobretot a causa de la incidència que hi tenia la poliploïdia (Stebbins, 1971; Petit & Thompson, 1999) –vegeu el subapartat següent. Darrerament, aquesta suposició s'ha posat en dubte, sobretot pel que fa a l'altitud, ja que no es detecten espècies amb mides de genoma grans en estudis de comunitats de muntanya (Loureiro et al., 2013 i referències que conté).

El paper dels canvis cromosòmics en l'especiació vegetal

Que els canvis en el nombre i la mida dels cromosomes poden jugar un paper important en l'especiació és quelcom que es reconeix des del primer quart del segle XX. Aquests canvis cromosòmics poden afectar directament la biologia dels organismes o generar l'escenari per a la diferenciació poblacional, tot establint barreres per a l'intercanvi genètic (Levin, 2002). El mal aparellament dels cromosomes durant la meiosi és un dels mecanismes principals que generen esterilitat, en especial en els híbrids. Podem classificar els canvis cromosòmics en dos grans grups, si bé sovint poden estar associats: els numèrics i els estructurals. Els numèrics són els que han estat més estudiats, perquè són els que s'aprecien amb més facilitat: el comptatge cromosòmic és una tasca relativament fàcil que produeix dades fiables i altament reproduïbles (Guerra, 2008).

No obstant, a vegades no és possible donar un nombre cromosòmic exacte (tal com va passar en els estudis amb el gènere *Saxifraga* d'aquesta tesi, vegeu l'apartat de resultats i discussió). En algunes ocasions, no es disposa de material (fruits o llavors que puguin germinar

o plantes vives en cultiu) adequat per al seu estudi; és llavors quan el recurs de valorar el nivell de ploïdia per la quantitat de DNA pot resultar especialment útil. Alguns grups de plantes són el que es podria qualificar de poc agraïts respecte a la facilitat de dur a terme recomptes cromosòmics (com veurem també en el cas esmentat abans d'aquesta memòria). Fins i tot en cas que no es doni cap d'aquests inconvenients hi pot haver una font d'incertesa en el nombre cromosòmic: els cromosomes B, components dispensables del genoma que no s'aparellen amb els cromosomes estàndards (cromosomes A) i que presenten modes irregulars d'herència amb la qual cosa es poden trobar en nombre variable fins i tot dins de cèl·lules d'un mateix individu (Jones et al., 2008; Houben et al., 2013). Solen diferenciar-se dels cromosomes A per la mida (i sovint, encara que no sempre, pel fet de no tenir centròmer). Si bé no està del tot clar quines implicacions evolutives tenen els cromosomes B a nivell d'espècie, si que se sap que poden generar-se espontàniament en resposta a noves condicions genòmiques, com ara després d'una hibridació (Houben et al., 2013) i que poden actuar com a agents diploïditzants després d'una poliploïdització (Jones & Houben, 2003).

El nombre cromosòmic, doncs, tot i ser un caràcter molt bàsic –i que podria prendre's per massa senzill–, és una font d'informació molt important en botànica sistemàtica i evolutiva (Stebbins, 1971; Favarger, 1978; Stace, 2000), encara a l'actualitat (Guerra, 2008; Stuessy, 2009, 2011; Garbari et al., 2012). A més, les tècniques de citogenètica molecular permeten de fer una anàlisi detallada del cariotip, en molts casos necessària per a aprofundir en aspectes de diferenciació i, en definitiva, d'evolució en plantes (Siljak-Yakovlev et al., 2014 i referències que conté).

Quan es parla de filogènia o d'evolució del cariotip, es sol considerar que només hi ha dos tipus de variacions importants en els nombres cromosòmics: la poliploïdia i la dispoloïdia (Guerra, 2008), tot i que, puntualment, es faci atenció als cromosomes B i a alguna altra font de variació en nombre cromosòmic.

La poliploïdia en plantes és un fenomen que ha rebut molta atenció des del seu descobriment, i durant dècades s'ha considerat l'únic mecanisme possible d'especiació instantània (saltacional) i que, a més, pot tenir lloc en simpatria (sense necessitat d'aïllament geogràfic entre els individus diploides i el nou llinatge poliploide) (Stebbins, 1950). Típicament s'ha postulat que les espècies poliploides es troben amb més freqüència en ambients extrems, com ara elevades latituds i altituds que les espècies diploides (p. ex. Tischler, 1935; Stebbins, 1950; Otto & Whitton, 2000; Levin, 2002; Weiss-Schneeweiss et al., 2013). Amb aquesta

assumpció, s'ha atribuït als poliploides una major resistència al fred i tolerància als fotoperíodes de dies llargs respecte als seus parents diploides (Levin, 2002; Husband et al., 2013). No obstant, la major incidència de la poliploïdia en augmentar la latitud sembla estar més relacionada amb la seva habilitat de colonitzar nous hàbitats (Grant, 1971; te Beest et al., 2012), com ara els guanyats amb el desglaç (Brochmann et al., 2004). En qualsevol cas, així com hi continua havent consens pel que fa a la latitud, la incidència creixent de la poliploïdia amb l'altitud no s'ha pogut provar encara avui dia (Stebbins, 1971; Loureiro et al., 2013).

La dispoloïdia és la variació del nombre cromosòmic bàsic (x) dins d'una població o una espècie i ha estat reconegut com un mecanisme important en l'evolució del cariotip de les espècies vegetals (Siljak-Yakovlev, 1996). Aquest canvi de nombre és estable i està associat freqüentment a canvis estructurals (Rieger et al., 1982). Els canvis estructurals o rearranjaments cromosòmics són principalment les inversions i les translocacions de fragments de cromosomes i, si bé són més difícils d'observar per tècniques citogenètiques clàssiques, poden jugar un rol primari en l'especiació, ja que redueixen la fecunditat o viabilitat dels individus que són heterozigots pel rearranjament (White, 1978).

Així doncs, els canvis cromosòmics poden afavorir l'especiació sense necessitat d'aïllament geogràfic, atès que els aparellaments entre individus amb els mateixos rearranjaments tendiran a presentar major aptitud. També se'ls atribueix un rol important en l'especiació per hibridació ja sigui en la multiplicació del nombre de cromosomes (al·lopoliploïdització) o bé en l'estabilització dels híbrids en homoploïdia (sense multiplicar el nombre de cromosomes -i, per tant, sense canviar gaire la mida del genoma- respecte de les espècies parentals) (Grant, 1971). Les diferències entre espècies en nombre i rearranjaments cromosòmics, doncs, poden jugar un paper molt complex: per una banda poden impedir la perpetuació del producte de la hibridació entre dues espècies que cohabitin, si genera una F_1 estèril. Per altra banda, però, com que dins d'una població no tots els individus tenen perquè presentar els mateixos rearranjaments, l'encreuament entre certs individus d'aquestes mateixes espècies podria donar lloc a un híbrid fèrtil, o bé alguns encreuaments tindrien més probabilitat de generar un híbrid amb capacitat d'estabilitzar-se. Recapitulant, els rearranjaments cromosòmics tant poden aïllar les espècies com permetre que acabi tenint lloc un intercanvi genètic que d'entrada semblava impossible o poc probable.

Els hàbitats de muntanya a la regió mediterrània: del messinià a l'actualitat passant per les glaciacions del quaternari

L'especiació no pot entendre's sense un marc geogràfic i temporal, ja que està estretament relacionada amb la proximitat en l'espai de poblacions o espècies properes entre les quals pugui donar-se (o no) intercanvi genètic. La regió mediterrània està caracteritzada per una gran complexitat geològica i paleoclimàtica (Nieto Feliner, 2014). Això inclou importants canvis a llarg termini com l'aridificació que va iniciar-se fa 9-8 Ma (van Dam, 2006), la qual va culminar amb al dessecament del mar Mediterrani en el que es coneix com la crisi salina del messinià (sovint abreujat MSC, per les seves inicials en anglès) quan va tancar-se l'estret de Gibraltar per moviment de subducció de plaques tectòniques fa 5,96-5,33 Ma (Krijgsman, 2002). La MSC és un dels dos punts de referència claus per entendre la gran diversitat d'espècies de la conca mediterrània, l'altre és l'inici del clima mediterrani (3,4-2,8 Ma; Suc, 1984). L'efecte que han tingut aquests dos processos sobre la biota és controvertit, atès que han promogut especiació i radiacions en alguns llinatges mentre que han estat el detonant de l'extinció d'altres (Fiz-Palacios & Valcárcel, 2013 i referències que conté). No obstant, diferents estudis amb datacions moleculars han trobat un buit similar en la cladogènesi de 36 llinatges mediterranis en el període entre 6,1 i 3,4 Ma (Fiz-Palacios & Valcárcel, 2013) que segurament reflecteixen un patró que és una combinació d'extinció d'espècies amb posteriors hibridació i radiació de les supervivents dins de cada llinatge.

Els estudis en regions muntanyoses europees, com ara els Alps, el que troben, però, són patrons biogeogràfics que semblen el resultat d'històries més recents, en les quals els llinatges previs que hi poguéss haver van desaparèixer a causa de les glaciacions del pleistocè (Nieto Feliner, 2014). Fins no fa gaire, es creia que les espècies alpines (així com també les àrtiques) s'expandien durant les èpoques fredes i quedaven restringides a les muntanyes (o als refugis nòrdics) durant els períodes interglacials, tot generant així el patró actual de tàxons vicariants entre els cims de les muntanyes europees; aquesta interpretació, no obstant, és considerada per alguns autors una simplificació excessiva (Schmitt, 2007). Les fortes oscil·lacions climàtiques del plistocè van forçar repetidament la contracció/expansió del rang altitudinal i/o latitudinal de moltes espècies (Hewitt, 1996), la qual cosa va propiciar, en especial a Europa, la formació de zones híbrides quan genomes que havien divergit en refugis diferents expandien els seus rangs i es trobaven (Hewitt, 2000).

Una altra característica important dels hàbitats de muntanya és que els gradients altitudinals permeten grans canvis ambientals en distàncies espacials petites (Nieto Feliner, 2011). Això promou adaptacions locals que –en el marc dels esmentats processos històrics d’aïllament i contactes secundaris– han conduït a l’increment de biodiversitat en altituds elevades (Gómez & Lunt, 2007; Fernández Calzado et al., 2012). A causa d’això, les plantes de muntanya es troben també entre les espècies més vulnerables a l’actual canvi climàtic, pel seu aïllament, la seva restringida àrea de distribució i les limitacions que tenen per a poder ampliar-la (García-Fernández et al., 2013). Entendre els processos microevolutius que han tingut lloc en aquests hàbitats, doncs, no és només important per a entendre com ha evolucionat la seva flora, sinó també per a fer prediccions de com li pot afectar el canvi global (si bé aquest darrer punt no es troba entre els objectius d’aquesta tesi doctoral).

Els grups de plantes d’estudi

Per tal de fer una aproximació al paper de la hibridació i l’aïllament geogràfic en l’especiació hem realitzat estudis biosistemàtics en quatre grups de plantes de muntanya, centrant-nos més en certs aspectes evolutius en determinats casos i també mitjançant diferents enfocaments metodològics. Aquests grups de plantes, dels quals es pot trobar informació detallada a les publicacions del compendi d’aquesta tesi doctoral, són:

- Grup d’espècies dels Pirineus i de les muntanyes Catalanídiques del gènere *Saxifraga*, subsecció *Triplinervium* (*Saxifragaceae*): hibridació, dispersió i aïllament.
- Caracterització de l’híbrid *Jacobaea ×mirabilis* (*Asteraceae*).
- Hibridació en les espècies alpines del gènere *Rhaponticum* (*Asteraceae*).
- Diversificació de les espècies del gènere *Artemisia* (*Asteraceae*) de l’alta muntanya europea: disploïdia i poliploïdia en vicariància.

OBJECTIUS

Com s'ha detallat a la introducció, la hibridació és un fenomen molt freqüent en plantes, però els híbrids solen ser estèrils. Existeixen barreres reproductives que dificulten l'intercanvi genètic entre espècies, però, no obstant aquest acaba tenint lloc. Això genera moltes preguntes, com ara les següents. Quines solen ser aquestes barreres i, sobretot, com aconseguen ser superades? Quin paper hi té l'aïllament geogràfic? Realment és la vicariància el procés que contribueix majoritàriament a la diversificació en hàbitats de muntanya?

L'objectiu d'aquesta tesi és trobar respostes a aquestes preguntes, tenint en compte que en els treballs anteriors del nostre grup les qüestions relatives a híbrids sempre han quedat per resoldre. Per això pretenem tractar les diferents qüestions en diversos grups de plantes que s'hi ajusten en base a estudis previs. Els grans temes que abordem amb aquesta idea –alguns d'ells amb diversos objectius específics– són els següents:

1) En primer lloc, ens proposem explicar com té lloc l'especiació per hibridació en un grup citogenèticament complex d'espècies de muntanya, la secció *Triplinervium* del gènere *Saxifraga* (*Saxifragaceae*). El primer objectiu dins d'aquest tema és aclarir tant com es pugui les relacions filogenètiques entre les espècies, les quals han estat molt emascarades per processos d'hibridació. Per a fer-ho, caldrà enfrontar-se a uns nombres cromosòmics molt variables entre i dins d'espècies, els quals tant poden haver-se originat en un escenari d'homoploïdia com d'al·lopoliploïdia. S'haurà de veure què poden aportar les quantitats de DNA sobre els nivells de ploïdia. En darrer lloc, caldrà veure què passa amb la hibridació espontània (híbrids F_1) que té lloc entre aquests tàxons: per a fer-ho, comprovarem si els híbrids són fèrtils, i si no ho són procurarem deduir a quins mecanismes podria ser deguda l'esterilitat i com s'ha pogut arribar a completar l'especiació per hibridació (per quins fenòmens o en quines condicions).

2) Per altra banda l'estudi de les *Saxifraga* esmentades al punt anterior també té l'objectiu d'investigar en profunditat dos tàxons: *Saxifraga genesiana*, endemisme del massís del Montseny i les Guàrdies, i *S. geranioides*, dels Pirineus. Si bé hi ha consens que *S. genesiana* és un tàxon generat per dispersió de *S. geranioides*, el nivell taxonòmic que li correspondria no està clar, i diversos autors la consideren o bé una espècie independent o bé

una subespècie de *S. geranioides*. Així, ens hem proposat de veure fins a quin punt les diferenciacions morfològica i genètica entre ambdós tàxons són biològicament prou importants com per a considerar-los entitats diferents –i a quin nivell– i quina importància hi té l'aïllament geogràfic.

3) A més, volem aprofundir en l'estudi dels híbrids F_1 i el seu tractament taxonòmic amb un treball de caracterització i tipificació de *Jacobaea ×mirabilis* (*Asteraceae*), tàxon de muntanya amb àrea de distribució molt restringida, híbrid entre dues espècies del gènere, *J. adonidifolia* i *J. leucophylla*, recentment segregades del gènere *Senecio* (Pelser et al., 2006). L'objectiu d'aquest treball és confirmar amb eines moleculars i cariològiques el seu origen híbrid i, a més, establir definitivament la seva nomenclatura, inclosa la designació del seu tipus nomenclatural, la qual cosa no s'ha fet fins ara.

4) Volent anar encara més enllà sobre com poden afectar els processos d'hibridació i introgressió en endemismes de muntanya, volem realitzar un treball sobre les dues espècies del gènere *Rhaponticum* (*Asteraceae*) que es troben als Alps: *R. heleniifolium* i *R. scariosum*. Estudis previs del nostre grup havien trobat evidències d'hibridació en alguns individus i els objectius que ens hem marcat consisteixen a veure si la hibridació entre aquests dos tàxons és quelcom generalitzat o bé puntual en certes localitats, si pot suposar una amenaça per a la persistència d'aquestes espècies parentals o bé si en realitat ha contribuït i contribueix a la seva especiació.

5) Finalment, pretenem aprofitar l'ampli coneixement del nostre grup en el gènere *Artemisia* (*Asteraceae*) per tal de treballar-hi sobre un aspecte en el qual encara no s'han conduït recerques: veure si les espècies de les muntanyes europees presenten diferències en paràmetres cariològics i citogenètics, com ara nombre bàsic cromosòmic, mida del genoma o marcatges d'rDNA respecte de la resta de tàxons del gènere; en especial volem saber si presenten més incidència de poliploidia o no. Volem valorar, a més, què és el que ha contribuït de manera més decisiva a la diversificació del grup: els processos de vicariància o bé altres factors, com ara mutacions cromosòmiques (p. ex. dispoloidia).

INFORME DELS DRS. M. TERESA GARNATJE ROCA I JOAN VALLÈS XIRAU, DIRECTORS DE LA TESI DE LA SRA. GEMMA MAS DE XAXARS GINER, SOBRE LA PARTICIPACIÓ QUE AQUESTA DOCTORANDA HA TINGUT EN CADASCUN DELS ARTICLES QUE PRESENTA A LA SEVA TESI I SOBRE ELS FACTORS D'IMPACTE I LA CATEGORITZACIÓ DE LES REVISTES EN QUÈ HAN ESTAT PUBLICATS O ENVIATS

La doctoranda Gemma Mas de Xaxars Giner és la primera autora en totes les publicacions de la tesi que presenta. La doctoranda ha estat la principal responsable del disseny experimental dels treballs, partint del seu projecte de tesi. Ha dut a terme treball de camp (recol·lecció de les mostres vegetals) i ha participat de manera molt activa en la determinació dels tàxons i la confecció dels plecs d'herbari. Ha obtingut, analitzat i discutit els resultats i ha liderat en l'elaboració dels articles o hi ha col·laborat. Els resultats de cap dels treballs presentats no han estat ni seran utilitzats de cap manera per a cap altra tesi doctoral.

A continuació esmentem els articles que constitueixen la tesi doctoral de Gemma Mas de Xaxars Giner, tot indicant, si escau, el factor d'impacte de la revista i la categorització d'aquesta en el seu àmbit, així com la participació de la doctoranda en cada publicació.

1) Mas de Xaxars, G., García-Fernández, A., Barnola, P., Martín, J., Mercadé, A., Vallès, J., Vargas, P., Vigo, J., Garnatje, T. 2015. Phylogenetic and cytogenetic studies reveal hybrid speciation in *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* (Saxifragaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 53: 53-62.

Publicació. El factor d'impacte d'aquesta revista (corresponent a l'any 2014, segons el JCR de la ISI web of Knowledge) és 1,488, i es troba en la posició 90 de 152 a *Plant Sciences* (Q2, segon quartil).

Autoria i participació de la doctoranda. Primera autora. Participació en el treball de camp, preparació de material, disseny del treball, obtenció, anàlisi i discussió de dades, participació important en la redacció de l'article.

2) Mas de Xaxars, G., Vallès, J., Garnatje, T., Mercadé, A., Martín, J., Barnola, P., Vigo, J. 2014. Relacions entre diverses espècies de *Saxifraga* dels Pirineus i de les muntanyes Catalanídiques. Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural, 78: 51-61.

Publicació. Aquest treball és publicat en una revista molt coneguda i apreciada a nivell nacional en el camp de les ciències naturals, amb sistema de revisió anònima per part de dos avaluadors, però no inclosa en el *Science Citation Index*. Els editors van triar un motiu gràfic d'aquest treball per a il·lustrar la portada del volum corresponent.

Autoria i participació de la doctoranda. Primera autora. Participació en el treball de camp, preparació de material, disseny del treball, obtenció, anàlisi i discussió de dades, participació important en la redacció de l'article.

3) Mas de Xaxars, G., Fridlender, A., Garnatje, T., Vallès, J. 2015. Molecular and cytogenetic confirmation of the hybrid origin of *Jacobaea ×mirabilis* (Asteraceae, Senecioneae), with nomenclatura notes on this name. *Phytotaxa*, 234: 271-279.

Publicació. El factor d'impacte d'aquesta revista (corresponent a l'any 2014, segons el JCR de la ISI web of Knowledge) és 1,318, i es troba en la posició 104 de 200 a *Plant Sciences* (Q3, tercer quartil).

Autoria i participació de la doctoranda. Primera autora. Preparació de material, disseny del treball, obtenció, anàlisi i discussió de dades, participació important en la redacció de l'article.

4) Mas de Xaxars, G., Vallès, J., Garnatje, T. 2015. The outcomes of hybridization in alpine *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, en fase final de redacció.

Publicació. El factor d'impacte d'aquesta revista, a la qual el treball serà enviat aviat, (corresponent a l'any 2014, segons el JCR de la ISI web of Knowledge) és 2,534, i es troba en la posició 54 de 200 a *Plant Sciences* (Q2, segon quartil).

Autoria i participació de la doctoranda. Primera autora. Participació en el treball de camp (recol·lecció) i en la preparació de material, participació en el disseny del treball, obtenció, anàlisi i discussió de dades, participació en la redacció de l'article.

5) Mas de Xaxars, G., Garnatje, T., Pellicer, J., Siljak-Yakovlev, S., Vallès, J., Garcia, S. 2015. Impact of dysploidy and polyploidy on the diversification of high mountain *Artemisia* (Asteraceae) and allies. *Alpine Botany*, publicat en línia.

Publicació. El factor d'impacte d'aquesta revista (corresponent a l'any 2014, segons el JCR de la ISI web of Knowledge) és 1,458, i es troba en la posició 95 de 200 a *Plant Sciences* (Q2, segon quartil).

Autoria i participació de la doctoranda. Primera autora. Preparació de material, disseny del treball, obtenció, anàlisi i discussió de dades, participació important en la redacció de l'article.

Barcelona, 16 de novembre del 2015

M. Teresa Garnatje Roca

Joan Vallès Xirau

Científica titular, CSIC

Catedràtic de Botànica, UB

Directors de la tesi doctoral de Gemma Mas de Xaxars Giner

DISCUSSIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS

En aquest apartat de la tesi es recull una síntesi dels resultats principals que s'han obtingut al llarg del seu desenvolupament, i la seva discussió. Tots ells es troben desenvolupats en els seus corresponents articles, els quals s'han inclòs al final d'aquesta memòria i en constitueixen el compendi de publicacions.

Hibridació i aïllament en el grup d'espècies dels Pirineus i de les muntanyes Catalanídiques del gènere *Saxifraga*, subsecció *Triplinervium* (*Saxifragaceae*)

L'estudi sobre un grup d'espècies de muntanya del gènere *Saxifraga* de la subsecció *Triplinervium* s'ha recollit en dues publicacions d'aquesta tesi (una al *Journal of Systematics and Evolution* i l'altra al Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural; publicacions 1 i 2 del compendi d'aquesta memòria), on hem inferit la importància dels processos d'hibridació i de l'aïllament en la formació de la diversitat actual. Els resultats d'aquests dos treballs, així com la seva discussió, s'exposaran conjuntament.

Les espècies de *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* endèmiques del nord-est de la península Ibèrica són el resultat de processos recurrents d'aïllament i hibridació. La nostra aproximació amb múltiples conjunts de dades (morfològiques, viabilitat dels híbrids, cromosòmiques, quantitat de DNA, moleculars) ha proporcionat eines valuoses per a inferir com ha tingut lloc la complexa evolució del genoma d'aquests tàxons.

El marcador nuclear usat per a la reconstrucció filogenètica (l'ITS), si bé delimita les espècies estudiades en aquest treball en un clade amb bon suport (PP = 100 %) separant-les de les de la resta de la península, no serveix per a aclarir les relacions dins del clade esmentat. La xarxa d'haplotips, construïda a partir de tres regions cloroplàstiques concatenades (*rp132-trnL*, *trnS-trnG-trnG*, *3'trnV-ndhC*), mostra que la majoria d'espècies presenten diferents haplotips que no estan directament connectats, i indica un possible origen múltiple d'aquestes espècies que inclouria hibridacions recíproques.

La comparació de les dades de mida del genoma obtingudes amb les d'altres espècies de la mateixa subsecció obtingudes en altres estudis (*S. conifera* Coss. & Durieu, Loureiro et al.,

2013; i la sèrie poliploide de *S. granulata* L., Redondo et al., 1996) ha permès establir que tots els tàxons del grup estudiat tenen el mateix nivell de ploïdia. Aquesta mena de comparacions prova la utilitat de les estimacions del nivell de ploïdia mitjançant la determinació de la mida del genoma, en especial en llinatges amb cromosomes petits i una dinàmica molt activa de canvi de nombres cromosòmics, com és el cas d'aquestes espècies, en els quals l'establiment del nombre cromosòmic pot resultar problemàtic. Aquest resultat ens porta a inferir que dins del clade esmentat, l'especiació per hibridació, així com els híbrids naturals estudiats, tenen lloc en homoploïdia, mentre que estudis previs havien considerat, en base als nombres cromosòmics, que tenia lloc per al·lopoliploïdia (Vargas & Nieto Feliner, 1995). Una possible interpretació és que, si s'han donat processos de poliploïdització, aquests són antics (haurien tingut lloc probablement a la base de la secció) i han estat acompanyats després per grans pèrdues de quantitat de DNA mantenint, però, nombres cromosòmics elevats. No obstant, la hipòtesi més plausible és que la gran variabilitat de nombres cromosòmics, dins i entre els tàxons, s'expliqui per una conjunció de processos de fissions centríques, presència de cromosomes B i especiació híbrida homoploide.

Els híbrids naturals que es formen en les zones on cohabiten dues espècies són estèrils. Aquesta esterilitat té lloc a nivell postzigòtic, ja que el pol·len dels híbrids té la mateixa viabilitat que el de les espècies parentals (segons el test d'Alexander, 1969), mentre que les seves llavors no arriben a completar el seu desenvolupament.

La inestabilitat cromosòmica del gènere (complexos disploides, aneuploïdia i cromosomes B; Favarger, 1965; Küpfer & Rais, 1983; Vargas & Nieto Feliner, 1995) podria ser la causant de l'esterilitat dels híbrids i alhora la responsable que puguin acabar superant-la i completar l'especiació en homoploïdia. Els recomptes cromosòmics en aquestes espècies són tècnicament complexos a causa de la mida petita dels cromosomes, la qual cosa dóna lloc per una banda a nombres cromosòmics imprecisos i per l'altra a la infravaloració de la presència de cromosomes B (que no podrien, en aquest cas, distingir-se per mida dels cromosomes A; Soltis, 1983) i l'atribució excessiva de casos d'aneuploïdia (Vargas, 1994). Els cromosomes B podrien explicar les diferències entre recomptes en un dels tàxons estudiats (*S. geranioides* L., $2n = \text{ca. } 44, \text{ ca. } 52$) així com la seva elevada variabilitat en la mida del genoma ($d.e. = 0,135$), i alhora haver actuat com a agents diploïditzants (Jones & Houben, 2003).

En aquest grup de plantes hem observat, doncs, dos dels possibles resultats, no excloents, d'una hibridació: 1) especiació per hibridació en homoploïdia, la qual hauria causat la reticulació i les incongruències entre marcadors nuclears i cloroplàstics que vàrem detectar,

i 2) hibridació espontània, que continua tenint lloc actualment i que dóna lloc a una F_1 d'híbrids estèrils. Els rearranjaments cromosòmics molt probablement han tingut un paper important en la determinació del resultat d'una hibridació, alhora que han originat nombres cromosòmics molt dispersos entre espècies malgrat presentar en alguns casos quantitats de DNA molt similars.

També hem detectat autoploiploïdia en una població de *S. moschata* Wulfen i en les dues espècies de *Saxifraga* de l'arxipèlag de Madeira. Aquestes es varen incloure en l'estudi de mida del genoma com a referent d'ambient on la hibridació no era possible. El que trobarem és que varen experimentar una poliploïdització en la colonització de l'illa de Porto Santo (*S. portosanctana* Boiss.) i una segona poliploïdització en saltar a l'illa de Madeira (*S. maderensis* D.Don). Podria ser, doncs, que la poliploïdització representés un avantatge en la colonització de nous hàbitats i/o en l'adaptació a noves condicions climàtiques com les que trobaren en la colonització de l'arxipèlag de Madeira.

Saxifraga genesiana P.Vargas del Montseny i les Guàrdies és un tàxon originat per dispersió de *S. geranioides* dels Pirineus. Aquests tàxons tenen categoria d'espècie segons Flora Iberica (Vargas, 1997) i categoria de subespècie a la Flora dels Països Catalans (Bolòs & Vigo, 1984). *Saxifraga genesiana* només presenta en totes les poblacions estudiades un ribotip i un haplotip de *S. geranioides*; això fa pensar que la colonització del Montseny va tenir lloc en un esdeveniment únic. L'aïllament geogràfic sembla, doncs, haver contribuït al canvi de freqüències al·lèliques per un procés de coll d'ampolla, però a poc més, atès que la diferenciació morfològica entre ambdós tàxons és mínima, sent l'ornamentació de la llavor l'únic caràcter clar de diagnosi.

No obstant això, l'aïllament geogràfic podria acabar contribuint, a la llarga, a la diferenciació genètica, no només perquè la variació tendeix a augmentar amb el temps, sinó sobretot perquè ambdós tàxons estan hibridant de forma natural amb congèneres diferents: *S. genesiana* amb *S. vayredana* Luizet i *S. geranioides* amb *S. pubescens* Pourr. i *S. moschata* (entre d'altres saxífragues pirenaïques). Els híbrids resultants d'aquests encreuaments formen una F_1 estèril, però, sent un procés que es dóna repetidament, podria acabar produint híbrids amb algun grau de fertilitat (Arnold, 1997) i això desembocaria en processos d'introgressió, que serien diferents en ambdós sistemes muntanyosos.

Caracterització de l'híbrid *Jacobaea × mirabilis* (Asteraceae)

Aquest treball, acceptat per a publicació a la revista *Phytotaxa* (publicació 3 del compendi d'aquesta memòria), contradiu en part una de les consideracions finals exposades en el treball de *Saxifraga* publicat al *Journal of Systematics and Evolution*: la de no seguir usant noms d'espècie (és a dir, emprant la nomenclatura binomial clàssica) per a anomenar híbrids que són una F_1 estèril. Aquest judici es va emetre seguint el criteri de Font i Quer (1953) que en la seva definició d'híbrid digué: “Els híbrids entre esp. d'un mateix gèn. es designen per una fórmula i, quan es considera útil i necessari, per un nom”. Ara bé, aquesta frase de Font i Quer és agafada de les Regles Internacionals de Nomenclatura Botànica d'Amsterdam (1950), però desapareix a partir del Codi Internacional de Nomenclatura Botànica de Sidney (1983). El Codi és quelcom dinàmic i es va modificant per tal d'aclarir situacions nomenclaturals dubtoses; el Codi, com tots els texts normatius, hauria de ser quelcom objectiu i indiscutible, però en molts casos concrets no ho és pas. De fet, els noms del Codi només responen a la necessitat de donar un rang taxonòmic a un organisme, i dir si un nom és útil o necessari és una cosa totalment subjectiva. En el cas dels híbrids de *Saxifraga*, contràriament al que ara ens ocupa, no ens va semblar que fos necessari donar-los nom.

El Codi vigent (l'anomenat de Melbourne; McNeill et al., 2012) recull la normativa per a anomenar els híbrids intergenèrics, interespecífics i entre rangs taxonòmics inferiors, ja siguin una F_1 o qualsevol generació filial encara que derivi de retroencreuaments. A un híbrid li pertoca el rang taxonòmic dels seus tàxons parentals (si aquests fossin de rang diferent llavors li pertocaria el rang inferior). Això vol dir que un híbrid interespecífic tindrà el rang d'espècie. Però això no significa que sigui una espècie biològicament parlant, només vol dir que taxonòmicament li pertoca el rang d'espècie. Confondre aquests dos conceptes és el que manté viu el debat sobre què són les espècies, un problema que és irresoluble i l'única solució passa per acceptar que diferents consideracions, sobre aquest concepte, poden ser vàlides.

L'estudi sobre *Jacobaea × mirabilis* es va plantejar inicialment com un treball que tenia com a objectiu la confirmació genètica del seu origen híbrid entre *Jacobaea adonidifolia* i *J. leucophylla*, dues espècies d'un gènere recentment segregat de *Senecio* (Pelser et al., 2006). Aquest híbrid és conegut des de 1857 als Pirineus Orientals i des de 1904 al Mont Mézenc, però no té els plecs tipus ben establerts i la combinació nova corresponent al canvi de gènere no es va realitzar de forma taxonòmicament correcta. Així, a més de confirmar la seva condició d' F_1 (probablement estèril) per seqüenciació i mida del genoma, n'hem realitzat una combinació nomenclatural (*Jacobaea × mirabilis* (Rouy ex Gaut.) Mas de Xaxars, Fridlender,

Garnatje et Vallès-Xirau), per tal de corregir els errors que vàrem trobar en aquest àmbit, i també la tipificació nomenclatural. El criteri pel qual hem optat finalment és que no cal contribuir a generar més noms (ja que la fórmula híbrida és nomenclaturalment igual de vàlida), però si els noms ja existeixen, llavors han de ser correctes.

Jacobaea ×mirabilis és un híbrid rar, perquè no té capacitat d'autoperpetuar-se i les àrees de distribució de les seves espècies parentals gairebé no es solapen: només als Pirineus Orientals, en el massís del Canigó, on ocupen diferents gradients altitudinals, i al Mézenc, on *J. leucophylla* té el seu límit de distribució i hi és rara. Quan *J. adonidifolia* i *J. leucophylla* se situen properes, com ara en jardins alpins, l'híbrid apareix amb facilitat. Aquesta capacitat d'hibridar sembla una característica molt comuna entre les *Jacobaea*, atès que a les flores es troben descrits híbrids entre pràcticament totes les espècies del gènere. La distribució d'haplotips que hem obtingut amb la xarxa, amb molts de compartits entre espècies, posa de manifest, a més, que el grup segurament s'ha diversificat a partir de processos d'hibridació introgressiva.

Hibridació en les espècies alpines del gènere *Rhaponticum* (Asteraceae)

L'estudi de les dues espècies dels Alps del gènere *Rhaponticum* Vaill. (Asteraceae), *R. heleniifolium* Gren. & Godr. i *R. scariosum* Lam., parteix d'unes recerques preliminars en què es va detectar l'existència d'hibridació i introgressió entre elles (Hidalgo, 2006). Això s'interpretà com una possible amenaça per a la conservació d'aquestes espècies. El treball que hem fet sobre aquest tema serà enviat a la revista *Botanical Journal of the Linnean Society* (publicació 4 del compendi d'aquesta memòria).

Es va realitzar un mostreig poblacional de *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* a la zona dels Alts Alps i s'hi trobà només una població en què coexistís amb *R. scariosum*. Es mostrejaren també les poblacions de *R. scariosum* properes. El material recol·lectat foren fulles, per a caracteritzar els espècimens, i capítols, per a estimar la freqüència d'hibridació en la generació F_1 . Es van seleccionar 1570 aquenis, que es van escanejar i posar a germinar segons el capítol de procedència (925 es varen pesar, mesurar i posar a germinar individualment). En total, 179 assoliren l'estadi de plàntula i només dues d'aquestes plàntules eren híbrides (1,12%). Entre els espècimens recol·lectats, només es trobà un híbrid, que presentava una morfologia del capítol intermèdia, i del qual no en germinà cap aqueni.

La caracterització de tots els individus recol·lectats i els germinats es feu per mitjà de la regió nuclear ITS, la qual permetia discernir pels polimorfismes tant els híbrids com les espècies parentals. La seqüenciació de les regions cloroplàstiques *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* i *3'trnV-ndhC* donà un únic haplotip per *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium*, dos per *R. scariosum* segons la regió geogràfica: un als Alts Alps i l'altre als Alps centrals i orientals. Sorprenentment, una de les plàntules híbrides presentava l'haplotip cloroplàstic de *R. scariosum* (dels Alts Alps) mentre que la seva planta mare i les dues altres plàntules que germinaren d'aquells capítol presentaven l'haplotip cloroplàstic de *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium*. Per mitjà d'aquest híbrid, doncs, hem detectat un cas d'herència paterna de cloroplast. No obstant, en haver trobat només un haplotip per espècie a la zona dels Alts Alps, no podem saber si l'herència paterna és el tipus normal d'herència cloroplàstica en el gènere *Rhaponticum* o bé si ho hem trobat per atzar en aquest híbrid, atès que se sap que les espècies amb herència materna de cloroplast poden presentar un percentatge petit d'herència paterna (p. ex. de l'1,86% en la també asteràcia *Helianthus verticillatus* E. Watson; Ellis et al., 2008).

Les anàlisis realitzades amb les regions seqüenciades, a més, apunten que *R. scariosum* podria ser una espècie d'origen híbrid homoploide i *R. heleniifolium* seria una de les seves espècies parentals. Ambdues espècies tenen el mateix nombre de cromosomes (Hidalgo et al., 2007) i quantitat de DNA similar (Hidalgo et al., no publicat). Les xarxes construïdes amb les regions nuclears ITS i ETS mostren tres agrupacions diferents ('1', '2' i '3') per a *R. scariosum* (figures 2 i 3, publicació 4). Aquestes dues regions no es van concatenar, perquè eren incongruents entre elles segons el test ILD (p valor = 0,0004). La diferència principal entre ambdues xarxes és la posició de *R. longifolium* subsp. *longifolium*, el qual queda inclòs dins l'agrupació '3' de *R. scariosum* en la xarxa de l'ETS. Aquesta agrupació inclou els espècimens de la zona dels Alps centrals, els quals se separen clarament dels espècimens dels Alts Alps (agrupacions '1' i '2'). Els espècimens de *R. scariosum* de l'agrupació '1', si bé són morfològicament iguals als de les altres agrupacions, se situen propers als híbrids en ambdues xarxes atès els polimorfismes que presenten en les dues regions. Aquest patró de polimorfismes és una de les evidències que fan pensar en un possible origen híbrid d'*R. scariosum*, però també es podrien explicar sota la interpretació que l'espècie *R. scariosum* es tracta en realitat de dues espècies críptiques, d'origen independent però que han convergit en la seva morfologia. No obstant, sigui quin sigui l'origen de *R. scariosum* (una sola espècie d'origen híbrid (o no), o dues espècies críptiques), sembla clar que a la zona dels Alts Alps han tingut lloc processos d'hibridació introgressiva amb *R. heleniifolium*.

Pel que fa a les regions cloroplàstiques seqüenciades, els espècimens de les agrupacions '1' i '2' presenten el mateix haplotip, molt proper a *R. heleniifolium*, mentre que els de l'agrupació '3' en presenten un altre molt distanciat de l'anterior. Això dona suport un cop més tant a la hipòtesi de l'origen híbrid com que s'hagi adquirit el cloroplast de *R. heleniifolium* per hibridació introgressiva. La poca variabilitat trobada dins de cada espècie (un únic haplotip per espècie a cada zona i cap patró geogràfic de polimorfismes en la regió ITS entre les poblacions de *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium*) podria ser el resultat de forts processos de coll d'ampolla durant les darreres glaciacions i les subsegüents colonitzacions postglacials.

El patró de distribució de la variabilitat genètica que hem trobat a *R. scariosum* és totalment congruent amb el que s'ha observat en altres espècies de substrat silici dels Alps. Alguns estudis (p. ex. Schönschwetter et al., 2005; Álvarez et al., 2009 i Thiel-Egenter et al., 2011) han detectat el que s'ha anomenat "zones de trencament" en la distribució d'al·lels dins d'espècies. Aquestes zones sovint coincideixen amb àrees de gran variació altitudinal, essent, doncs, molt difícil que pugui tenir lloc intercanvi genètic entre poblacions de bandes diferents d'aquestes àrees. Les localitats de *R. scariosum* de les agrupacions '1' i '2' estan separades de les de l'agrupació '3' per la Vall d'Aosta (Thiel-Egenter et al., 2011), la qual s'ha vist que suposa un trencament en l'intercanvi genètic entre les poblacions de l'oest i les de l'est en moltes espècies silicícoles dels Alps (Schönschwetter et al., 2005).

La datació realitzada amb les regions cloroplàstiques *rpl32-trnL* i *trnL-trnF* amb un punt de calibratge fòssil (Barres et al., 2013) suggereix que les espècies de *Rhaponticum* de la zona mediterrània ("clade occidental" de la reconstrucció filogenètica del gènere; Hidalgo et al., 2006) haurien radiat durant la crisi salina del messinià (MSC). Les espècies alpines semblen sorgir d'un esdeveniment de cladogènesi posterior, a meitats del pliocen (fa uns dos milions d'anys). No obstant, els espècimens de *R. scariosum* de la zona central dels Alps (els de l'agrupació '3') se situen en un punt diferent, en el clade format per les espècies nord-africanes, amb un haplotip originat fa uns cinc milions d'anys. Aquest llarg període sense cladogènesi fa pensar que s'està donant separació incompleta de llinatges, segurament a causa de l'extinció de llinatges durant la MSC (Fiz-Palacios & Valcárcel, 2013).

En el cas que s'hagués donat especiació per hibridació homoploide en l'origen de *R. scariosum*, aquesta podria haver-se completat en simpatria i donat lloc a una asincronia floral. Malgrat que els dos tàxons no solen conviure, ja que presenten també diferents preferències de substrat, apareixen junts en algunes localitats. En aquest cas estarien actuant, doncs,

mecanismes d'aïllament prezigòtic. L'asincronia floral s'hauria establert segurament afavorida per la hibridació entre ambdós tàxons, atès que els encreuaments entre individus de la mateixa espècie presentarien major viabilitat. Això és el que hem observat: l'encreuament de les dues espècies genera híbrids, però a una freqüència molt baixa (de l'ordre de l'1%), de manera que no suposa cap amenaça important d'introgressió a l'actualitat, ja que, a més, no ha germinat cap aqueni de l'individu híbrid adult que s'ha pogut caracteritzar. Això indicaria que els híbrids, a més d'una baixa presència, podrien tenir també una menor viabilitat.

En referència a l'estat de conservació de *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* i *R. scariosum* als Alps, hem observat un creixement de les seves poblacions en els últims anys. Aquest creixement segurament està relacionat amb la protecció de les seves àrees de distribució, la qual ha comportat, d'entre d'altres prohibicions, la restricció de la pastura. Els atacs dels herbívors són l'amenaça més gran per a algunes espècies de *Rhaponticum*, com ara *R. canariense* DC., la qual va experimentar un fort creixement només protegint amb tanques les seves poblacions (Carqué et al., 2004). Mantenir el grau de protecció actual als Alps és, doncs, vital i, alhora, suficient per a la supervivència de les espècies de *Rhaponticum* d'aquesta zona.

Disploïdia i poliploïdia, en vicariància, en la diversificació de les espècies del gènere *Artemisia* (Asteraceae) de l'alta muntanya europea

Després d'haver aprofundit en l'estudi de la hibridació, veiem que es tracta essencialment d'un fenomen local que té lloc en simpatria, però que es dona generalment quan entren en contacte llinatges propers que han divergit, en gran part, aïllats. Si bé totes les poblacions d'una espècie a priori tenen el mateix potencial per a divergir, no totes acaben donant lloc a noves variants encara que estiguin aïllades. "Ni l'aïllament ni el temps *per se* fan res per a la modificació de les espècies" (Darwin, 1872). Això ens porta a preguntar-nos quines són les fonts més importants que generen la variació i, per tant, altres maneres d'especiar sense implicar hibridació. La mutació és la font més evident de variació, però actua de forma lenta i la variació que genera és en gran part neutra. Així, el que ens hem proposat és aprofundir més en el paper dels canvis cromosòmics com a font de variació que pot crear noves combinacions gèniques, les quals és més probable que presentin diferents valors adaptatius (a més de poder tenir un paper aïllador enfront de la hibridació, atès que la fertilitat entre llinatges disminueix quan s'incrementen els rearranjaments cromosòmics).

Amb aquest punt de partida, en aquest darrer treball de la tesi (publicat a la revista *Alpine Botany*; publicació 5 del compendi d'aquesta memòria) estudiem els processos d'especiació i diversificació en les espècies d'*Artemisia* de les muntanyes europees. Aquest grup està compost per vuit espècies, cinc de les quals tenen una distribució esparsa i restringida, formant poblacions isolades i petites, mentre que les altres tres presenten una àmplia distribució. Alhora, és un grup en el qual conviuen els dos nombres cromosòmics bàsics del gènere ($x = 9$ i $x = 8$, el darrer originat per dispoloidia descendent; Vallès et al., 2011) amb algunes espècies poliploides. Aquest estudi té, a més, l'interès afegit que aquest gènere ha estat intensament estudiat (en bona part pel nostre grup de recerca; Vallès et al., 2011 i referències que conté), amb la qual cosa es disposava de moltes dades per a comparacions i anàlisis estadístiques. Els resultats més destacats s'exposen a continuació.

Les comparacions realitzades a partir de l'arbre filogenètic construït amb seqüències d'ITS i ETS concatenades mostren que la dispoloidia descendent és un fenomen que ha tingut lloc de manera independent diverses vegades en el gènere *Artemisia*. No obstant això, el clade on se situen les espècies de muntanya presenta un percentatge significativament més elevat d'espècies dispoloides que la resta del gènere i aquestes, a més, tenen una quantitat de DNA també significativament més gran que les espècies dispoloides d'altres clades. Si bé ja s'havia inferit que la dispoloidia descendent era deguda a un procés de translocació robertsoniana entre dos cromosomes acrocèntrics (Vallès et al., 2011), això s'ha pogut confirmar en aquest estudi a partir d'observacions d'una preparació de FISH. La fusió dels braços llargs dels cromosomes dona lloc a un cromosoma metacèntric llarg que, a més, sembla tenir una tendència afegida a acumular DNA, la qual cosa explicaria les diferències de mida del genoma trobades. Els braços curts es fusionarien en un petit cromosoma també metacèntric que es perdria o bé podria anar-se mantenint com a cromosoma B, diversos dels quals han estat observats en algunes espècies del clade (p. ex. a *A. incana* (L.) Druce amb $2n = 16, 16+2B, 16+5B$; Tabur et al., 2012).

Per contra, el clade de muntanya presenta una freqüència de poliploides inferior a la resta del gènere (un 27% enfront d'un 56% segons dades de Vallès et al., 2011). Aquest resultat pot semblar sorprenent en un primer moment, ja que ha estat clàssicament considerat que la poliploidia conferia un avantatge selectiu i evolutiu, especialment en ambients de muntanya, per totes les noves combinacions gèniques que pot donar multiplicar el genoma. Per altra banda, *Artemisia* és un gènere amb quantitat de DNA mitjana-gran, de manera que multiplicar la quantitat de DNA podria no ser-li tan avantatjós en aquests ambients i, de fet, en estudis de mida del genoma en comunitats de muntanya no es detecten espècies amb

genomes grans (Loureiro et al., 2013). Per contra, la comparació realitzada en aquest treball amb artemísies àrtiques ha revelat que, entre aquestes, la poliploidia es dona en una freqüència del 65% (un percentatge més elevat que l'inferit per Tkach et al., 2008). Aquest resultat està en consonància amb l'argument exposat a la introducció sobre la major habilitat dels poliploides per a colonitzar nous hàbitats (Grant, 1971), com ara els originats amb el desglaç (Brochmann et al., 2004) o bé, com vèiem en el cas de *Saxifraga* (primera publicació del compendi d'aquesta memòria), en illes oceàniques.

És interessant també observar que, si bé els tàxons disploides ($x = 8$) dominen en freqüència entre les espècies d'*Artemisia* d'alta muntanya, són en realitat molt locals en la seva distribució. Això indica que probablement es van generant freqüentment per fragilitat centromèrica en poblacions no disploides i que es mantenen localment sense que presentin cap combinació al·lèlica beneficiosa extra respecte als tàxons filogenèticament propers amb base $x = 9$. La disploidia podria considerar-se, de fet, com un mecanisme d'especiació instantània, atès que, un cop apareix en un individu, els encreuaments d'aquest amb la resta de la població (no disploide) presentaran viabilitat baixa o nul·la. Aquest és, doncs, un altre exemple de diversificació associada a disploidia en ambients de muntanya, com és també el cas del gènere *Phyteuma* (*Campanulaceae*; Schneeweiss et al., 2013).

Per altra banda les dues úniques espècies d'*Artemisia* de muntanya poliploides són d'àmplia distribució i els seus nombres cromosòmics són $2n = 32$ i $2n = 34$, la primera amb quatre cromosomes metacèntrics grans i amb dos de la mateixa mena la segona. Aquest fet ens portaria a pensar que la poliploidització podria conferir certs avantatges per a la colonització de noves localitats en els disploides d'*Artemisia* malgrat el suposat efecte deleteri de tenir massa quantitat de DNA en els ambients de muntanya postulat en treballs anteriors.

En conjunt, el que observem és que les espècies diploides amb nombre bàsic $x = 9$ són la minoria entre les espècies d'*Artemisia* de muntanya i que no es defineixen patrons de diversificació per aïllament o vicariància entre les espècies d'àmplia distribució que es reparteixen al llarg dels cims muntanyosos europeus. Són els canvis en nombre cromosòmic, ja sigui, sobretot, per mutacions cromosòmiques (disploidia) o bé per mutacions genòmiques (poliploidització), els mecanismes que semblen contribuir de forma més important a la diversificació d'aquest grup de plantes d'alta muntanya.

Consideracions finals

Al llarg dels treballs que constitueixen el compendi de publicacions d'aquesta tesi hem pogut veure que les principals fonts de diversificació en plantes són l'intercanvi genètic (hibridació i introgressió) i les mutacions cromosòmiques. Per contra, l'aïllament geogràfic *per se* no genera diversificació, però permet la fixació de noves combinacions cromosòmiques per processos de coll d'ampolla, o bé facilita o impedeix el contacte entre diferents espècies, és a dir que determina quines espècies poden acabar hibridant. També hem vist que, en els casos que hem estudiat i a diferència del que se sol postular, la poliploidia no és la font més comuna de noves espècies, sinó que l'especiació sol tenir lloc en el mateix nivell de ploïdia, ja sigui després d'una hibridació (especiació híbrida homoploide o hibridació introgressiva) o bé per canvi del nombre cromosòmic bàsic (disploidia).

CONCLUSIONS

A continuació es presenten les conclusions més rellevants, estructurades per treballs.

Hibridació i aïllament en el grup d'espècies dels Pirineus i les muntanyes Catalanídiques del gènere *Saxifraga*, subsecció *Triplinervium* (*Saxifragaceae*)

- Els marcadors moleculars emprats per tal d'aclarir les relacions filogenètiques d'aquest grup d'espècies han resultat incongruents entre ells i mostren un escenari evolutiu de reticulació que es pot interpretar com el resultat de processos recurrents d'aïllament i hibridació.
- Les estimacions del nivell de ploïdia a partir de les mesures de quantitat de DNA d'aquestes espècies han permès inferir que l'especiació per hibridació ha tingut lloc en el mateix nivell (homoploïdia), i han descartat el seu origen poliploide malgrat que presenten nombres cromosòmics molt dispars entre elles.
- La gran variabilitat de nombres cromosòmics, dins i entre tàxons, podria ser deguda a una conjunció de processos de fissions cèntriques, presència de cromosomes B i hibridació.
- Quan cohabitin, aquestes espècies produeixen híbrids naturals, que constitueixen una F_1 estèril. L'esterilitat té lloc a nivell postzigòtic, atès que els híbrids no arriben a completar el desenvolupament de les llavors, mentre que el seu pol·len sembla fèrtil; aquest fet s'ha atribuït a la inestabilitat cromosòmica del gènere.
- La poliploïdia no ha tingut un paper destacat en la diversificació d'aquest grup de muntanya, havent-se trobat només una població poliploide en una espècie. Per contra, si que podria haver contribuït a la colonització d'un nou ambient (les illes de Porto Santo i Madeira) per part d'unes altres espècies de *Saxifraga* de la mateixa subsecció.
- *Saxifraga genesiana* és un tàxon originat a partir de *S. geranioides* per dispersió des del Pirineu cap al Montseny. La diferenciació morfològica entre ambdós tàxons, el primer dels quals ha experimentat un procés de coll d'ampolla, encara és incipient. No obstant, la diferenciació morfològica podria augmentar amb el temps, per exemple, per introgressió, ja que totes dues s'estan hibridant amb diferents congèneres.

Caracterització de l'híbrid *Jacobaea ×mirabilis* (Asteraceae)

- *Jacobaea ×mirabilis* és un híbrid F₁ de les espècies *J. adonidifolia* i *J. leucophylla*. La seva morfologia, la seva quantitat de DNA i la seva seqüència ITS, són perfectament intermèdies entre les de les seves espècies parentals. La caracterització genètica, doncs, en confirma el caràcter híbrid, fins ara només postulat amb dades morfològiques.
- L'híbrid apareix només en les dues zones de contacte de les seves espècies parentals (el massís del Canigó i el mont Mézenc) i sembla ser estèril, ja que no se n'ha trobat cap aqueni, ni tampoc té capacitat de reproduir-se vegetativament atès que només se n'han localitzat individus aïllats que es mantenen durant anys en el mateix indret.
- Hem proposat una nova combinació (*Jacobaea ×mirabilis* (Rouy ex Gaut.) Mas de Xaxars, Fridlender, Garnatje et Vallès-Xirau) per tal de corregir l'error nomenclatural que s'havia comès en fer el canvi de gènere d'aquest tàxon de *Senecio* a *Jacobaea* i hem efectuat la tipificació del seu nom.

Hibridació en les espècies alpines del gènere *Rhaponticum* (Asteraceae)

- Amb els resultats obtinguts en l'estudi de les relacions entre les dues espècies de *Rhaponticum* dels Alps, qualsevol de les tres hipòtesis plantejades a l'inici d'aquest treball [(i) l'origen de l'espècie *R. scariosum* per especiació híbrida homoploide, on *R. heleniifolium* seria una de les espècies parentals, ii) hibridació introgressiva a la zona dels Alts Alps per mitjà de la qual *R. scariosum* hauria capturat el cloroplast de *R. heleniifolium*, i iii) *R. scariosum* dels Alts Alps i el de la resta dels Alps són en realitat dues espècies críptiques]] és probable, si bé sembla clar que si més no a la zona dels Alts Alps s'han donat processos d'hibridació i introgressió.
- La freqüència d'hibridació actual entre *R. heleniifolium* i *R. scariosum* és baixa (~1%). Això per una banda és degut al fet que no solen cohabitar perquè tenen diferent preferència de substrat, i per l'altra al fet que presenten asincronia floral. Aquesta segurament s'hauria seleccionat durant els processos d'hibridació introgressiva.
- Per altra banda, de l'únic espècimen híbrid adult que s'ha pogut caracteritzar per les seves seqüències nuclears i la seva morfologia intermèdia, no n'ha germinat cap aqueni, la qual cosa fa pensar que els híbrids, a més de baixa freqüència, presenten menor viabilitat.

- La caracterització d'una plàntula híbrida ha revelat, a més, un cas d'herència paterna de cloroplast. Es requereixen més estudis per a veure si és quelcom comú en el gènere o és un cas aïllat detectat per atzar.
- La datació que s'ha realitzat amb seqüències cloroplàstiques infereix que les espècies occidentals del gènere *Rhaponticum* haurien radiat durant la crisi salina del messinià, mentre que les espècies alpines haurien sorgit posteriorment, a mitjan plistocè.
- L'haplotip de *R. scariosum* dels Alps centrals i orientals s'agrupa amb les espècies del nord d'Àfrica, després d'un llarg període sense cladogènesi. Això fa pensar que s'està donant separació incompleta de llinatges a causa de processos d'extinció.
- Finalment, la hibridació no ha resultat una amenaça per a la conservació de les espècies de *Rhaponticum* dels Alps. Mantenir la protecció del seu hàbitat és una mesura suficient per al manteniment i el creixement de les seves poblacions.

Disploïdia i poliploïdia, en vicariància, en la diversificació de les espècies del gènere *Artemisia* (Asteraceae) de l'alta muntanya europea

- Les comparacions realitzades mostren que el clade que conté les espècies d'*Artemisia* d'alta muntanya (en la reconstrucció filogenètica feta amb seqüències d'ITS i d'ETS concatenades) té una freqüència d'espècies disploides molt més elevada que la resta del gènere (46% enfront de 14%).
- La dispoloïdia s'ha originat independentment en diferents llinatges del gènere per processos de translocació robertsoniana. En les espècies del clade de muntanya aquest procés dona lloc a un cromosoma metacèntric llarg que, a més, sembla tenir una tendència afegida a acumular DNA, amb la qual cosa presenten major quantitat de DNA que les espècies disploides d'altres llinatges d'*Artemisia*.
- Per contra, el clade de muntanya presenta una freqüència de poliploides inferior a la resta del gènere (27% enfront de 56%), mentre que entre les espècies àrtiques la freqüència és del 65%. Aquests patrons coincideixen amb estudis de mida de genoma en comunitats de muntanya (que no detecten espècies amb genomes grans, i *Artemisia* tindria una mida mitjana-gran) i estudis que postulen la major aptitud dels poliploides en la colonització de nous ambients, com ara els originats amb el desglaç a les zones àrtiques.
- Les espècies disploides d'alta muntanya, però, si bé són més freqüents, tenen una distribució molt local. Això s'ha interpretat com que es van generant per fragilitat

centromèrica en poblacions no disploides i es van mantenint localment sense presentar una major capacitat d'expansió.

- En el grup considerat hi ha només dues espècies d'àmplia distribució, una d'elles diploide (*A. eriantha*) i l'altra, tetraploide (*A. umbelliformis*). Dins de cadascuna, l'estudi de les quantitats de DNA no ha permès observar cap patró de diversificació per aïllament o vicariància en els massissos muntanyencs europeus.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander MP (1969)** Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Biotech. Histochem.* 44: 117-122.
- Álvarez N, Thiel-Egenter C, Tribsch A, Holderegger R, Manel S, Schönswetter P, Tarbelet P, Brodbeck S, Gaudeul M, Gielly L, Küpfer P, Mansion G, Negrini R, Paun O, Pellecchia M, Rioux D, Schüpfer F, Van Loo M, Winkler M, Gugerly F, IntraBioDiv Consortium (2009)** History or ecology? Substrate type as a major driver of spatial genetic structure in Alpine plants. *Ecol. Lett.* 12: 632-640.
- Anderson E (1949)** Introgressive hybridization. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Anderson E, Hubricht L (1938)** Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *Am. J. Bot.* (1938): 396-402.
- Anderson E, Stebbins GL (1954)** Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8: 378-388.
- Arnold ML (1997)** Natural hybridization and Evolution. Oxford University Press. Oxford.
- Arnold ML (2006)** Evolution through genètic Exchange. Oxford University Press. Oxford.
- Arnold ML, Larson EJ (2004)** Evolution's new look. *Wilson Q.* 60-73.
- Arnold ML, Martin NH (2009)** Adaptation by introgression. *J. Biol.* 8: 82.1-82.3.
- Barres L, Sanmartín I, Anderson CL, Susanna A, Buerki S, Galbany-Casals M, Vilatersana R (2013)** Reconstructing the evolution and biogeographic history of tribe Cardueae (Compositae). *Am. J. Bot.* 100: 867-882.
- Bennett MD, Leitch IJ (2011)** Nuclear DNA amounts in angiosperms: Targets, trends and tomorrow. *Ann. Bot.* 107: 467-590.
- Berlin B (1992)** Ethnobiological classification: principles of categorization of plants and animals in traditional societies. Princeton University Press. Princeton.
- Bolòs O, Vigo J (1984)** Flora dels Països Catalans. Barcino. Barcelona.

- Brochmann C, Brysting A, Alsos IG, Borgen L, Grundt HH, Scheen AC, Elven R (2004)** Polyploidy in arctic plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 82: 521-536.
- Carqué E, Durbán M, Marrero M, Bañares A (2004)** Influencia de los herbívoros introducidos en la supervivencia de *Stemmacantha cynaroides* (Asteraceae). Una especie amenazada de las islas Canarias. *Vieraea* 32: 97-105.
- Chambers G (2012)** The species problem: seeking new solutions for philosophers and biologists. *Biol. Philos.* 27: 755-765.
- Coyne JA, Allen H (2004)** Speciation. Sinauer Associates. Sunderland. MA.
- Darwin C (1839)** Journal of Researches into the Geology and Natural History of the various countries visited by H.M.S. Beagle, under the command of Captain Fitzroy, R.N. from 1832 to 1836. London: Henry Colburn.
- Darwin C (1859)** The origin of species. Modern Library. New York.
- Darwin C (1872)** C. Darwin to August Weismann. In: Darwin F ed. 1887. The life and letters of Charles Darwin, including an autobiographical chapter. London. John Murray. III:155-158.
- Dennet DC (1995)** Darwin's Dangerous Idea: Evolution and the Meanings of Life. Simon & Schuster, Inc. New York.
- Dobzhansky T (1937)** Genetics and the origin of species. Columbia University Press, New York.
- Dobzhansky T (1973)** Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. *Am. Biol. Teach.* 35:125-129.
- Dobzhansky T (1974)** Introductory remarks. In Ayala FJ, Dobzhansky T (eds.). *Studies in the philosophy of biology: reduction and related problems*. University of California Press. Berkeley and Los Angeles. 1-2.
- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003)** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytom. Part A* 51: 127-128.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J (eds) (2007)** Flow cytometry with plant cells. Analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley-VCH Verlag. Darmstadt.

- Dyer AF (1979)** Investigating chromosomes. Edward Arnold. London.
- Ellis JR, Bentley KE, McCauley DE (2008)** Detection of rare paternal chloroplast inheritance in controlled crosses of the endangered sunflower *Helianthus verticillatus*. *Heredity* 100: 574-580.
- Favarger C (1965)** Notes de caryologie alpine, IV. *Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat.* 88: 15-23.
- Favarger C (1978)** Philosophie des comptages de chromosomes. *Taxon* 27: 441-448.
- Fernández Calzado MR, Molero Mesa J, Merzouki A, Casares Porcel M (2012)** Vascular plant diversity and climate change in the upper zone of Sierra Nevada, Spain. *Plant Biosyst. – An Int J Deal with all Asp Plant Biol* 146: 1044-1053.
- Fitzpatrick BM, Fordyce JA, Gavrillets S (2008)** What, if anything, is sympatric speciation? *J. Evol. Biol.* 21: 1452-1459.
- Fiz-Palacios O, Valcárcel V (2013)** From Messinian crisis to Mediterranean climate: A temporal gap of diversification recovered from multiple plant phylogenies. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 15: 130-137.
- Font Quer P (1953)** Diccionario de botánica. Ed. Labor, SA, Barcelona.
- Fontdevila A, Moya A (2003)** Evolución. Origen, adaptación y divergencia de las especies. Ed Síntesis, Madrid.
- Garbari F, Bedini G, Peruzzi L (2012)** Chromosome numbers of the Italian flora. From the Caryologia foundation to present. *Caryologia* 65: 62-71.
- García-Fernández A, Iriondo JM, Escudero A, Fuertes Aguilar J, Nieto Feliner, G (2013)** Genetic patterns of habitat fragmentation and past climate-change effects in the Mediterranean high-mountain plant *Armeria caespitosa* (Plumbaginaceae). *Am. J. Bot.* 100: 1641-1650.
- Grant V (1971)** Plant speciation. Columbia University Press. New York.
- Gómez A, Lunt D (2007)** Refugia within refugia: patterns of phylogeography concordance in the Iberian Peninsula. In: Weiss S, Ferrand N (eds) *Phylogeography of Southern European Refugia*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 155-188.

- Greilhuber J, Doležel J, Lysák MA, Bennett MD (2005)** The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'Genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot.* 95:255-260.
- Greilhuber J, Borsch T, Müller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W (2006)** Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae with chromosomes of bacterial size. *Plant Biol.* 8: 770-777.
- Guerra M (2008)** Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet. Genome Res.* 120: 339-350.
- Hawkins J, Kim H, Nason J (2006)** Differential lineage-specific amplification of transposable elements is responsible for genome size variation in *Gossypium*. *Genome Res.* 16: 1252-1261.
- Hewitt GM (1996)** Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58: 247-276.
- Hewitt GM (2000)** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hey J (2001)** The mind of species problem. *Trends Ecol. Evol.* 16: 326-329.
- Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Garnatje T, Susanna A (2006)** Phylogeny of *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae) and related genera inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data: taxonomic and biogeographic implications. *Ann. Bot.* 97: 705-714.
- Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Garnatje T, Sussana A, Siljak-Yakovlev S (2007)** Karyological evolution in *Rhaponticum* Vaill. (Asteraceae, Cardueae) and related genera. *Bot. J. Linn. Soc.* 153: 193-201.
- Houben A, Banaei-Moghaddam A, Klemme S (2013)** Biology and evolution of B chromosomes. In: Greilhuber J, Doležel J, Wendel JF (eds.) *Plant genome diversity*. Springer. Vienna. 2: 149-165.
- Husband BC, Baldwin SJ, Suda J (2013)** The incidence of polyploidy in natural plant populations: Major patterns and evolutionary processes. In: Greilhuber J, Doležel J, Wendel JF (eds.) *Plant Genome Diversity*. Springer. Vienna. 2: 255-276.

- Jahn I, Lother R, Senglaub K (1989)** Historia de la Biología. Teorías, métodos, instituciones y biografías breves. Editorial Labor. Barcelona.
- Jones RN, Houben A (2003)** B chromosomes in plants: Escapees from the A chromosome genome? *Trends Plant Sci.* 8: 417-423.
- Jones RN, Villegas W, Houben A (2008)** A Century of B Chromosomes in Plants: So What? *Ann. Bot.* 101: 767-775.
- Kirkpatrick M, Ravigné V (2002)** Speciation by natural and sexual selection: models and experiments. *Amer. Nat.* 159: S22-S35.
- Krijgsman W (2002)** The Mediterranean: mare nostrum of earth sciences. *Earth Planet. Sci. Lett.* 205: 1-12.
- Küpfer P, Rais JR (1983)** Index des nombres chromosomiques des Spermatophytes de la Suisse I. *Bot. Helvet.* 93: 11-25.
- Leitch IJ, Bennett MD (2004)** Genome downsizing in polyploid plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 82: 651-663.
- Levin DA (2002)** The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press. New York.
- Loureiro J, Castro M, Cerca de Oliveira J, Mota L, Torices R (2013)** Genome size variation and polyploidy incidence in the alpine flora from Spain. *Anales Jard. Bot. Madrid* 70: 39-47.
- Magner LN (2002)** A History of the Life Sciences, Marcel Dekker Inc., New York.
- Mallet J (2005)** Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20: 229-237.
- Margulis L, Sagan D (2002)** Acquiring Genomes: A Theory Of The Origin Of Species. Basic Books, New York.
- Marques I, Nieto Feliner G, Martins-Loução MA, Fuertes Aguilar J (2012)** Genome size and base composition variation in natural and experimental *Narcissus* (Amaryllidaceae) híbridos. *Ann. Bot.* 109: 257-264.
- Mayr E (1942)** Systematics and the origin of species. Columbia Univ. Press, New York.

- Mayr E (1963)** Animal species and evolution. Harvard University Press.
- Mayr E (1982)** The growth of biological thought. Diversity, evolution and inheritance. Harvard University Press, Cambridge.
- Mayr E (1996)** What is a species, and what is not? *Philos. Sci.* 63: 262-277.
- McNeill CJ, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud'homme van Reine WF, Smith GF, Wiersema JH, Turland NJ (2012)** International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Koeltz Scientific Books. Königstein.
- Nieto Feliner G (2011)** Southern European glacial refugia: A tale of tales. *Taxon* 60: 365-372.
- Nieto Feliner G (2014)** Patterns and processes in plant phylogeography in the Mediterranean Basin. A review. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 16: 265-278.
- Otto SP, Whitton J (2000)** Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34: 401-437.
- Paterson HEH (1985)** The recognition concept of species. In ES Vrba (ed.) Species and speciation. Pretoria. *Transvaal Mus. Monogr.* 4: 21-19.
- Pavord A (2005)** The naming of names: The search for order in the world of plants. Bloomsbury Publishing. New York.
- Pellicer J, Fay MF, Leitch IJ (2010)** The largest eukaryotic genome of them all? *Bot. J. Linn. Soc.* 164: 10-15.
- Pellicer J, Leitch IJ (2014)** The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants. *Methods Mol. Biol.* 1115: 279-307.
- Pelser PB, Veldkamp JF, Van der Meijden R (2006)** New combinations in *Jacobaea* Mill. (Asteraceae – Senecionae). *Compositae Newslett.* 44: 1-11.
- Petit C, Thompson JD (1999)** Species diversity and ecological range in relation to ploidy level in the flora of the Pyrenees. *Evol. Ecol.* 13: 45-66.

- Prančl J, Kaplan Z, Trávníček P, Jarolímová V (2014)** Genome Size as a Key to Evolutionary Complex Aquatic Plants: Polyploidy and Hybridization in *Callitriche* (Plantaginaceae). *PLoS ONE* 9:e105997.
- Raven PH, Berlin B, Breedlove DE (1971)** The origins of taxonomy. A review of its historical development shows why taxonomy is unable to do what we expect of it. *Science* 174: 1210-1213.
- Redondo N, Horjales M, Brown S, Villaverde C (1996)** Biometric and cytometric study of nuclear DNA within *Saxifraga granulata* L. *Bol. Soc. Brot., ser. 2* 67: 287-301.
- Rieger R, Michaelis A, Green MM (1982)** Diccionario de genética y citogenética. Alhambra. Madrid.
- Rouhan G, Gaudeul M (2014)** Plant Taxonomy: A Historical Perspective, Current Challenges, and Perspectives. *Methods Mol. Biol.* 1115: 1-37.
- Schmitt T (2007)** Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Front. Zool.* 4: 1-13.
- Schneeweiss GM, Pachschröll C, Tribsch A, Schönschwetter P, Barfuss MH, Esfeld K, Weiss-Schneeweiss H, Thiv M (2013)** Molecular phylogenetic analyses identify Alpine differentiation and dysploid chromosome number changes as major forces for the evolution of the European endemic *Phyteuma* (Campanulaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 69: 634-652.
- Schönschwetter P, Stehlik I, Holderegger R, Tribsch A (2005)** Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps. *Mol. Ecol.* 14: 3547-3555.
- Schweber S (1977)** The origin of the Origin revisited. *J. Hist. Biol.* 10: 229-316.
- Siljak-Yakovlev S (1996)** La dysploïdie et l'évolution du caryotype. *Boccone* 5: 211-220.
- Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Vičić V, Robin O (2014)** Molecular cytogenetics (FISH and fluorochrome banding): resolving species relationships and genome organization. *Methods Mol. Biol.* 1115: 309-323.
- Soltis DE (1983)** Supernumerary chromosomes in *Saxifraga virginensis* (Saxifragaceae). *Am. J. Bot.* 70: 1007-1010.

- Stace CA (2000)** Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21th centuries. *Taxon* 49: 451-477.
- Stebbins GL (1950)** Variation and evolution in plants. Columbia University Press. New York.
- Stebbins GL (1959)** The role of hybridization in evolution. *Proc. Am. Phil. Soc.* 103: 231-251.
- Stebbins GL (1971)** Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley. London.
- Stebbins GL (1980)** Tipos de especiación. In: Dobzhansky T, Ayala FJ, Stebbins GL, Valentine JW, Evolución. Ediciones Omega. Barcelona, pp 197-234.
- Stuessy TF (2009)** Plant taxonomy. The systematic evaluation of comparative data, 2nd edn. Columbia University Press, New York.
- Stuessy TF (2011)** Multiple sources of comparative data for creative monography. In: Stuessy TF, Lack HW (eds) Monographic plant systematics. Fundamental assessment of plant biodiversity. Ruggell ARG Ganeter Verlag KG, pp 33-47.
- Suc JP (1984)** Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. *Nature* 307: 429-432.
- Suda J, Trávníček P (2006)** Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research. *Cytom. Part A* 69: 273-280.
- Swift H (1950)** The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 36: 643-654.
- Tabur S, Civelek Ş, Öney S, Yılmaz Ergün ŞB, Kurşat M, Türkoğlu İ (2012)** Chromosome counts and karyomorphology of some species of *Artemisia* (Asteraceae) from Turkey. *Turk. J. Bot.* 36:235-246.
- te Beest M, Le Roux JJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubešová M, Pyšek P (2012)** The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Ann. Bot.* 109: 19-45.
- Thiel-Egenter C, Alvarez N, Holderegger R, Tribsch A, Englisch T, Wohlgemuth T, Colli L, Gaudeul M, Gielly L, Jogan N, Linder HP, Negrini R, Niklfeld H, Pellecchia M, Rioux D, Schönswetter P, Taberlet P, Van Loo M, Winkler M, IntraBioDiv Consortium, Gugerli F.**

- (2011) Break zones in the distributions of alleles and species in alpine plants. *J. Biogeogr.* 38: 772-782.
- Tischler G (1935)** Die Bedeutung der Polyploidie für die Verbreitung der Angiospermen erläutert an den Arten Schleswig-Holsteins, mit Ausblicken auf andere Florengebiete. *Bot. Jahrb.* 67: 1-36.
- Tkach NV, Hoffmann MH, Röser M, Korobkov AA, von Hagen KB (2008)** Parallel evolutionary patterns in multiple lineages of arctic *Artemisia* L. (Asteraceae). *Evolution* 62: 184-98.
- Vallès J, Garnatje T (2005)** *Artemisia* and its allies: genome organization and evolution and their biosystematic, taxonomic and phylogenetic implications in the *Artemisiinae* and related subtribes (Asteraceae, Anthemideae). In Sharma KA, Sharma A (eds.): Plant genome: biodiversity and evolution, 1(Part B), 255-285.
- Vallès J, Garcia S, Hidalgo O, Martín J, Pellicer J, Sanz M, Garnatje T (2011)** Biology, genome evolution, biotechnological issues, and research including applied perspectives in *Artemisia* (Asteraceae). *Advances Bot. Res.* 60: 349-419.
- van Dam JA (2006)** Geographic and temporal patterns in the late Neogene (12–3 Ma) aridification of Europe: the use of small mammals as paleoprecipitation proxies. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 238: 190-218.
- Vargas P (1994)** Estudios biosistemáticos en el género *Saxifraga*: Serie *Ceratophyllae* (s. l.). Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
- Vargas P (1997)** *Saxifraga* L. In: Castroviejo S, Laínz M, López González C, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L (eds): Flora Iberica. Real Jardín Botánico. C.S.I.C: Madrid 5: 162-242.
- Vargas P, Nieto Feliner G (1995)** Cytotaxonomical study of *Saxifraga* series *Ceratophyllae* s.l. (Saxifragaceae). *Plant Syst. Evol.* 197: 200-223.
- Via S (2001)** Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends Ecol. Evol.* 16: 381-390.
- Weiss-Schneeweiss H, Emadzade K, Jang TS, Schneeweiss GM (2013)** Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants. *Cytogenet. Genome Res.* 140: 137-150.

White MJD (1978) Modes of speciation. Freeman & Company. San Francisco.

Wilson EO (2013) Letters to a young scientist. WW Norton & Company. New York.

Winge O (1917) The chromosomes. Their numbers and general importance. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carsberg* 13: 131-275.

COMPENDI DE PUBLICACIONS

Estudis filogenètics i citogenètics revelen especiació per hibridació a *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* (*Saxifragaceae*)

Gemma Mas de Xaxars, Alfredo García-Fernández, Pere Barnola, Joan Martín, Arnau Mercadé, Joan Vallès, Pablo Vargas, Josep Vigo i Teresa Garnatje

Journal of Systematics and Evolution 53: 53-62 (2015)

La hibridació ha jugat un paper important en l'evolució del gènere *Saxifraga*, on ha causat reticulació i un gran nombre d'híbrids descrits. No obstant, poc se sap sobre com ha tingut lloc l'especiació per hibridació en el gènere. Nosaltres ens centrem, en aquest estudi, en un grup d'espècies de *Saxifraga* de la subsecció *Triplinervium* dels Pirineus, les quals estan estretament relacionades, tot i que les seves relacions filogenètiques no estan resoltes. Per tal d'intentar desemmascarar processos d'hibridació críptics (o antics), hem analitzat una regió nuclear (ITS) i tres de cloroplàstiques (*rpl32-trnL*, *trnS-trnG-trnG*, and *3'trnV-ndhC*), així com la quantitat de DNA. També hem dut a terme estudis de morfologia i viabilitat de pol·len i llavors per tal d'avaluar l'estat dels híbrids espontanis. A més, s'ha inferit els nivells de ploïdia a partir de la quantitat de DNA per a dues espècies de Madeira de la mateixa subsecció, les quals no s'esperava que haguessin patit processos d'hibridació recents. Els marcadors moleculars revelaren múltiples esdeveniments de reticulació els quals, tal com suggereixen les quantitats de DNA i els nombres cromosòmics, han tingut lloc en homoploïdia (sense multiplicació del genoma després de la hibridació). A més, en algunes espècies o poblacions han tingut lloc processos d'autopoliploïdització, en especial en la colonització de l'arxipèlag de Madeira. La variació en els nombres cromosòmics sembla estar relacionada amb esdeveniments de fissions centríques, els quals poden haver donat lloc també a la formació dels cromosomes B que s'han trobat en alguns tàxons. Els híbrids espontanis no produeixen llavors viables i això podria ser degut al fet que les espècies parentals presenten diferents nombres cromosòmics. L'especiació per hibridació probablement hauria tingut èxit, històricament, per rearranjaments cromosòmics els quals, a més, haurien donat lloc a nous nombres cromosòmics, més o menys intermedis, en aquest grup de tàxons.

Research Article

Phylogenetic and cytogenetic studies reveal hybrid speciation in *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* (Saxifragaceae)

Gemma Mas De Xaxars^{1*}, Alfredo García-fernández^{2†}, Pere Barnola², Joan Martín¹, Arnau Mercadé³, Joan Vallès¹, Pablo Vargas⁴, Josep Vigo⁵, and Teresa Garnatje²

¹Laboratori de Botànica—Unitat Associada CSIC, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n 08028, Barcelona, Catalonia, Spain

²Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB), Passeig del Migdia s/n, Parc de Montjuïc 08038, Barcelona, Catalonia, Spain

³Unitat de Botànica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643 08028, Barcelona, Catalonia, Spain

⁴Real Jardín Botánico, CSIC, Plaza de Murillo 2 28014, Madrid, Spain

⁵Secció de Ciències Biològiques, Institut d'Estudis Catalans, Carrer del Carme 47 08001, Barcelona, Catalonia, Spain

[†]Current address: Departamento de Biología y Geología. ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, C/Tulipán s.n., 28933 Móstoles, Spain.

*Author for correspondence. E-mail: gemma.masdexaxars@gmail.com. Tel.: 34934024490. Fax: 34935035879.

Received 10 March 2014; Accepted 7 May 2014; Article first published online 24 June 2014

Abstract Hybridization has played an important role in *Saxifraga* evolution causing reticulation and a high number of described hybrids, but little is known about how hybrid speciation had occurred in the genus. We focus on a group of closely related *Saxifraga* species of the subsection *Triplinervium* from Pyrenees, the phylogenetic relationships of which remain unsolved. Trying to unmask cryptic (or ancient) hybridization processes, we analyze one nuclear (ITS) and three plastid regions (*rpl32-trnL*, *trnS-trnG-trnG*, and *3' trnV-ndhC*), as well as nuclear DNA content. Pollen and seed morphology and viability studies were carried out to evaluate the status of spontaneous hybrids. DNA ploidy levels were also inferred for the two Madeiran taxa (of the same *Saxifraga* subsection), where recent hybridization processes are not expected. Molecular markers revealed multiple reticulation events, which, as suggested by DNA content and chromosome numbers, have occurred in homoploidy (without genome doubling after hybridization). In addition, autopolyploidy has occurred in some species or populations, especially in the Madeiran archipelago colonization. Chromosome number variation appears to be related to centric fission events, which also could lead to the formation of the B chromosomes inferred in some taxa. Spontaneous hybrids do not produce viable seeds and this could be due to differences in parental chromosome numbers. Hybrid speciation has probably been successful by chromosomal arrangements, which also generated new, more or less intermediate, chromosomal numbers in this group of taxa.

Key words: autopolyploidy, B chromosomes, genome size, homoploidy, hybrid speciation, phylogeny.

Hybridization has long been recognized as an important mechanism of plant speciation (Anderson & Stebbins, 1954; Soltis et al., 2009), not only in ancient angiosperm evolution but also in the recent formation of new species (Arnold, 1997). Hybrid speciation can occur at the same ploidy level as parental taxa (homoploid hybrid speciation) or via allopolyploidy (heteroploid hybrid speciation, including hybridization and chromosome doubling, Grant, 1981). Homoploid hybrid speciation has usually been considered as a rare process, because it requires the development of reproductive isolation in sympatry (Rieseberg, 1997). In contrast, allopolyploidy has been supposed to have been a much more common phenomenon, because genome doubling facilitates its identification and reduces or eliminates the possibility of a new polyploid backcrossing with its parents (Soltis & Soltis, 2009). Nevertheless, during the last years the cases of speciation in homoploidy are increasing in the literature (e.g., Marques et al., 2012; Vega et al., 2013),

confirming that it is an underestimated process, which usually remains cryptic in the evolutionary history of many plant groups.

Saxifraga L. subsect. *Triplinervium* (Gaudin) Gornall (Saxifragaceae) offers a good species complex to study hybrid speciation. Previous studies have suggested extensive hybridization and reticulation (Vargas, 2000), involving allopolyploidy for a particular closely related species (e.g., *S. osloensis* Knaben, Brochmann et al., 1996). *Saxifraga* is also well known by the occurrence of natural hybrids (Luizet, 1931; Webb & Gornall, 1989) and for being a karyologically complex group. This is due to technical difficulties linked to chromosome size and morphology (Favarger, 1965; Vargas, 1994; Mas de Xaxars et al., 2014) and to the cytotoxic mechanisms inferred: (i) dysploidy (Küpfer & Rais, 1983), (ii) aneuploidy (Vargas, 1994), (iii) B chromosomes occurrence (Soltis, 1983), and (iv) polyploidy (Brochmann et al., 1996). These phenomena often generate imprecise counts, heterogeneous putative base

chromosome numbers (Favarger, 1965; Küpfer & Rais, 1983) and a great chromosome number variability between sister species (Vargas & Nieto-Feliner, 1995).

We focus the present work on nine species of *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* distributed across the Pyrenees and some neighboring mountains (Montseny-Guilleries massif), in NE Iberian Peninsula. These taxa were selected because they (i) are closely related, but their relationships remain unclear (Vargas, 2000), (ii) are endemic of small territories (Vargas, 1997; with the exception of *S. moschata*), (iii) present a great chromosome number variation, which could be masking either homoploid or allopolyploid speciation processes, and (iv) produce spontaneous hybrids when they cohabite. We carried out genome size measurements in order to establish DNA ploidy levels, use new chloroplast markers to generate a haplotype network and analyze our new populational ITS sequences with the previous published (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) with the aim of reconstruct species relationship. For comparative purposes, we also obtain the genome size of two closely related subsect. *Triplinervium* species endemic of the Madeiran archipelago (*S. maderensis* and *S. portosanctana*; Vargas et al., 1999; Vargas, 2000). This comparison is interesting because of their high chromosome numbers ($2n = \text{ca. } 100$, $\text{ca. } 124$ and $2n = \text{ca. } 57$, respectively, references in suppl.) and hybridization with other congeners is not expected due to their geographic isolation. Experimental studies on pollen grains and seeds were also used to shed further light in the determination of the viability of three spontaneous hybrids and their introgression capacity. We especially focused on *S. ×cadevallii*, because its endemism to Montseny-Guilleries massif allowed us to study the entire distribution area of this taxon.

Material and Methods

Plant material

A total of 49 populations of 14 taxa of *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* were collected for this study (Appendix I). Population sampling was carried out covering the entire distribution area in the studied region. For each population, leaves, flowers, and seeds were collected from 1 to 28 individuals depending on the study performed (Appendix I). Material from young leaves was dried and preserved in silica gel. For *S. maderensis* and *S. portosanctana* only material for genome size measurements was collected. Voucher specimens for each population sampled were deposited in the herbarium BCN (Centre de Documentació de Biodiversitat Vegetal, Universitat de Barcelona).

Pollen and seed study

Pollen grains from each of all 12 Pyrenean-Montseny-Guilleries (hereafter Pyrenean) taxa were acetolyzed for light microscopy following the micromethod of Avetissian (1950) and for scanning electron microscopy (hereafter SEM) observation using gold for sputter coating to study exine surface and pollen ornamentation. Size variation of pollen was estimated by measuring the polar axis (P) and the equatorial diameter (E) of 30 grains per population by light microscopy with the AxioCam software (Carl Zeiss,

Jena, Germany). Alexander's (1969) test was performed for the analyses of pollen grain viability (detection of aborted and non-aborted pollen grains).

Seed ornamentation of five samples from each Pyrenean taxon (Appendix I, except *S. praetermissa*) was also observed by SEM following the procedure described above for the pollen grain treatment. SEM observations were carried out at the Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona. Seeds were kept at 4°C for several months, and a growth chamber was used to test germination in constant conditions of 20°C and 12 h photoperiod.

DNA content assessment

Fresh young leaves of each collected plant (275 individuals, Appendix I and Table 1) were co-chopped with the appropriate standard using a razor blade with an internal standard in the proportions 2:1 in 1200 µL of LBo1 buffer (Doležal et al., 1989) with 8% of Triton X-100 and supplemented with 100 µg/mL ribonuclease A (RNase A, Boehringer, Meylan, France) in a plastic Petri dish. *Lycopersicon esculentum* Mill. "Montfavet 63-5" (2C = 1.99 pg), *Petunia hybrida* Vilm. "PxPc6" (2C = 2.85 pg), *Pisum sativum* L. "Express long" (2C = 8.37 pg) were used as internal standards (Marie & Brown, 1993; Lepers-Andrzejewski et al., 2011) and were first analyzed separately in 600 µL of LBo1 buffer to locate their peak positions. Nuclei were filtered through a 70-µm nylon filter in order to eliminate cell debris before the addition of 36 µL of propidium iodide (1 mg/mL, solution in water; Invitrogen, Eugene, OR, USA). For each individual, two samples were extracted, kept on ice and analyzed independently. Fluorescence analysis was carried out using an Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA) at the Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, with the standard configuration as described in Garnatje et al. (2004). Acquisition was stopped at 8000 nuclei. The DNA content was calculated for 10 of the aforementioned runs, assuming a linear correlation between the fluorescence signals (of the stained nuclei) and DNA amount. Mean and standard deviations were calculated for 2C values of each population based on five studied individuals. The mean of the half-peak coefficient of variation (HPCV) was also calculated for both target plant and internal standard.

Differences in DNA content between and within species and populations were tested with a General Linear Model, considering species as a fixed factor and the origin population as random. All statistical analyses were performed using SPSS package 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

DNA extraction, amplification, and sequencing

DNA from at least one individual per population (total 54, see Appendix I) was extracted using the CTAB method (Doyle & Doyle, 1987) as modified by Soltis et al. (1991) from silica gel-dried leaves collected in the field. In the case of *S. praetermissa*, herbarium material was used, but the protocol for DNA extraction was similar to that for silica gel-dried tissues. A total of 42 individuals from *S. genesiana*, *S. geranioides*, *S. vayredana*, and *S. ×cadevallii* (*S. genesiana* × *S. vayredana*) populations were added and extracted for haplotype networks.

Amplification of ITS regions by PCR was performed using primers ITS1 and ITS4 developed by White et al. (1990). The PCR

Table 1 Values (mean \pm standard deviation) of genome size (in pg) obtained by flow cytometry for the taxa studied (Anglos population of *Saxifraga moschata* (Smos4, Appendix I) is indicated separately)

Section	Subsection	Taxon	N	2C \pm SD (pg)	2C (Mbp) [†]	HPCV [‡] samples (%)	HPCV [‡] standards (%)	DNA ploidy level	Chromosome numbers
<i>Saxifraga</i>	<i>Triplinervium</i>	<i>S. conifera</i> [¶]	8	1.310 \pm 0.02	1281			2X	42
		<i>S. moschata</i>	14	1.310 \pm 0.045	1281	3.14	4.94	2X	22–28, 44–48, 52, ca. 56
		<i>S. vayredana</i>	30	1.360 \pm 0.037	1329	3.53	3.54	2X	62, 64
		<i>S. \timesjeanpertii</i>	8	1.380 \pm 0.044	1351	2.89	3.63	2X	–
		<i>S. pubescens</i> subsp. <i>pubescens</i>	23	1.420 \pm 0.033	1387	2.59	4.28	2X	26, 28
		<i>S. intricata</i>	22	1.430 \pm 0.057	1399	3.40	4.46	2X	32, 34
		<i>S. pentadactylis</i> subsp. <i>pentadactylis</i>	20	1.490 \pm 0.033	1461	3.90	4.50	2X	32 + 5B
		<i>S. \timescadevallii</i>	10	1.530 \pm 0.035	1500	3.35	3.95	2X	–
		<i>S. \timesbubariana</i>	12	1.560 \pm 0.036	1524	2.84	5.03	2X	–
		<i>S. geranioides</i>	55	1.700 \pm 0.135	1667	2.81	4.49	2X	ca. 44, ca. 52
		<i>S. fragilis</i>	36	1.740 \pm 0.060	1706	3.51	3.71	2X	64
		<i>S. genesiana</i>	30	1.750 \pm 0.043	1709	2.54	4.05	2X	ca. 44
		<i>S. moschata</i> (Anglos)	5	2.590 \pm 0.086	2531	3.24	3.22	4X	ca. 56
		<i>S. portosanctana</i>	5	2.92 \pm 0.08	2856	5.84	1.41	4X	ca. 54, ca. 60
		<i>S. maderensis</i>	5	7.52 \pm 0.23	7355	0.38	4.16	8X	ca. 100, ca. 108, ca. 124
	<i>Saxifraga</i>	<i>S. granulata</i> [§]		1.35 \pm 0.03	1320			2X	22
		<i>S. granulata</i> [§]		3.54 \pm 0.08	3462			4X	44
		<i>S. granulata</i> [§]		4.76	4655			5X	52
<i>Porphyron</i>		<i>S. oppositifolia</i> L. subsp. <i>oppositifolia</i> [¶]	5	2.93 \pm 0.02	2866			2X	26, 52
		<i>S. paniculata</i> Mill. [¶]	5	3.20 \pm 0.02	3130			2X	28
<i>Ligulatae</i> Haworth									
<i>Gymnopera</i>		<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i> (Gillot) D. A. Webb [¶]	5	3.21 \pm 0.06	3139			2X	28

Chromosome numbers reported in literature are provided (no reports are indicated with “–”). N, number of individuals sampled per taxa.

[†]1 pg = 978 Mbp (Doležel et al., 2003); [‡]Half-peak coefficient of variation; cDNA amount from [§]Redondo et al. (1996) and [¶]Loureiro et al. (2013). References for chromosome numbers in supplementary information (Table S1).

profile began with 4 min at 95 °C followed by 30 cycles of 1 min 30 s denaturing at 94 °C, 2 min annealing at 55 °C and 3 min extension at 72 °C, with a final extension step of 15 min at 72 °C. Furthermore, three plastid regions were also amplified: *rpl32-trnL*, primers *rpl32-F* and *trnL*^{UAG} (Shaw et al., 2007), *trnS-trnG*, primers *trnS*^{GCU} and *3'trnG*^{UUC} (Shaw et al., 2005), and *3'trnV-ndhC*, primers *trnV*^{UAC}x2 and *ndhC* (Shaw et al., 2007). The PCR protocols for these regions were carried out as follow: *rpl32-trnL*: 94 °C at 3 min; 34 cycles of 40 s at 95 °C, 40 s for annealing at 54 °C and 1 min 40 s extension at 72 °C, with a final step of 10 min at 72 °C. *trnS-trnG*: 80 °C, 5 min; 30 \times (95 °C, 1 min; 66 °C, 4 min); 66 °C, 10 min. *3'trnV-ndhC*: 80 °C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, primer annealing at 50 °C for 1 min, followed by a ramp of 0.3 °C/s to 65 °C, and primer extension at 65 °C for 4 min; followed by a final extension step of 5 min at 65 °C. PCR were performed using a Thermocycler (MJ Research PTC 200, Basel, Switzerland). Final PCR products were checked on 1.2% agarose gels. Direct sequencing of the amplified DNA segments was performed using BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (PE Biosystems, Foster City, CA), following the protocol recommended by the manufacturer. ITS1, ITS4, *rpl32-F*, *trnL*^{UAG}, *3'trnG*^{UUC}, and *ndhC* were used as primers for amplification of the respective regions. Nucleotide sequencing was carried out at the Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, on an ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (PE Biosystems).

Phylogenetic analyses and genetic differentiation

For the phylogenetic analyses, 85 sequences of ITS region (49 new from this study) and 222 plastid sequences were used (3 plastid regions from 74 individuals, see Appendix I for the accession numbers). Nucleotide sequences were edited with Chromas 1.56 (Technelysium Pty, Tewantin, Australia). DNA sequences were aligned visually by sequential pair-wise comparison using BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999). Indels were treated as binary characters following the “simple indel coding method” (Simmons & Ochoterena, 2000). *Saxifraga spathularis* (sect. *Gymnopera* D. Don) and *S. aizoides* (sect. *Porphyron* Tausch.) were used as outgroup.

Data sets were analyzed using jModeltest (Darriba et al., 2012) to determine the sequence evolution model that best described the present data according to the AIC criterion. This model (SYM + G) was used to perform a Bayesian analysis using the program Mr. Bayes 3.2.1 (Huelsenbeck et al., 2001). Four Markov chains were run simultaneously for 10 000 000 generations, and these were sampled every 1000 generations. Data from the first 1000 generations were discarded as the “burn-in” period, after confirming that likelihood values had stabilized prior to the 1000th generation. The 50% majority rule consensus phylogeny and posterior probability (PP) of nodes were calculated from the remaining sample.

TCS 1.21 (Clement et al., 2000) was used to estimate relationships among haplotypes for the three plastid regions concatenated, applying the method of Templeton et al. (1992).

Only nucleotide substitutions were analyzed to this end. Ribotype and haplotype variation was evaluated using DnaSp v5 (Librado & Rozas, 2009).

Results

Palynology and seed morphometry

Pollen viability, assessed by Alexander's test (Alexander, 1969), was >90% in all analyzed populations. For *Saxifraga ×cadevallii*, *S. ×bubaniiana* (*S. geranioides* × *S. pubescens* subsp. *pubescens*) and *S. ×jeanpertii* (*S. moschata* × *S. pubescens* subsp. *pubescens*), for which no previous information was available, SEM images revealed that hybrids' seeds were malformed and without the ornamentation showed by the other studied taxa (Mas de Xaxars et al., 2014). Although *S. ×cadevallii* pollen grains were as fertile as those of the other species, according to this staining method, its seeds were significantly smaller and did not germinate at all, whereas those of the parental taxa looked normal and germinated in considerable proportions (45–70%). SEM images of seed covers of all pure species confirmed previously described secondary ornamentation (Fernández Areces et al., 1988; Vargas, 1997).

DNA content assessment

The mean of 2C values are shown in Table 1 for all the studied populations. Values ranged from 1.31 pg (*S. moschata*) to 2.59 pg (*S. moschata*, Anglos population). The highest standard deviation (0.135) was found in *S. geranioides*. Natural hybrids analyzed (*S. ×cadevallii*, *S. ×bubaniiana*, and *S. ×jeanpertii*) showed intermediate values for DNA content with respect to their parental taxa (Table 1). We found a positive correlation between DNA content (2C, pg) and pollen volume (Spearman correlation coefficient, $r_s = 0.496$, $P = 0.001$). No significant correlation ($r_s = 0.471$, $P = 0.201$) was found between DNA content and the number of chromosomes reported for Pyrenean taxa (Table 1).

ITS phylogeny

The length of the ITS1-5.8S-ITS2 ranged from 663 to 667 bp. Alignment required the introduction of indel characters, and the aligned matrix was 694 bp long. Thirty-six variable sites were detected, 29 of which were parsimony-informative. *Saxifraga ×bubaniiana* and *S. ×jeanpertii* ITS sequences were discarded for analysis and unpublished due to heterozygous gap presence that hampers chromatograms' reading. The tree based on Bayesian inference is shown in Fig. 1. The correspondence between supported clades and geographical areas occurs only in a few cases. Individuals from the Pyrenees are grouped in a single clade with a PP of 100%, with the exception of *S. aquatica*. *Saxifraga fragilis* accessions are the only ones that cluster in a monophyletic clade (PP = 100%). Three of the studied taxa (*S. intricata*, *S. moschata*, and *S. pubescens*) are clearly polyphyletic since they were placed in different and well-supported clades (PP = 100%). The populations of the remaining taxa showed short branches and low support (PP < 85%).

Plastid phylogeny and haplotype network

The aligned matrix of the three plastid regions (*rpl32-trnL*, *trnS-trnG-trnG*, and *3'trnV-ndhC*) was 1813 bp long (554, 606, and

653 bp, respectively). Sixteen variable sites were detected, 12 of them being parsimony-informative. The tree based on 15 different sequences of the 10 taxa sampled showed well-supported clades in the Bayesian inference reconstruction. The network showed a considerable number (27) of missing (extinct or not found) haplotypes. Only one loop was retrieved, which indicated low homoplasy of the plastid sequences and two well-defined clades. Also, the plastid network revealed the complex evolutionary history of the group because there is no clear relationship between haplotype clades and species (Fig. 2). No geographic pattern was detected in the haplotype network. *Saxifraga geranioides* was central to the network with four haplotypes (H1, H5, H12, and H13, Fig. 2) of different lineages. In contrast, we only found one haplotype (H1) for the 13 accessions of the morphologically similar *S. genesiana*, which was also present in two individuals of *S. geranioides*, which is distributed in the eastern Pyrenees (Sger4 and Sger7, Appendix 1). Accessions of *S. fragilis* had an internal position, which contrast with their position in the ITS tree (Fig. 1).

Discussion

Interpreting high variation in chromosome numbers with little variation of DNA content

All genome size values provided here are new records for the taxa examined (according to the RBG Kew C-values database, Bennett & Leitch, 2012) and provide a significant increase in nuclear DNA amount information on the genus *Saxifraga*. The rapid estimation of ploidy level using flow cytometry is increasingly gaining appreciation in biosystematic studies (Lysak & Lexer, 2006 and references therein), adopting the concept of DNA ploidy level (Suda & Trávníček, 2006). Comparing with the previous DNA amounts from other sections (Loureiro et al., 2013; Table 1) and the polyploid series of *S. granulata* L. (Redondo et al., 1996; Table 1), Pyrenean *Saxifraga* measured show a diploid DNA level with the exception of one tetraploid population of *S. moschata*, which presents a 2C value of 2.59 pg, that is, 1.9 times higher than the mean value of the species (1.31 pg). Interestingly, this mean value is the minimum observed among the studied taxa and coincides with the value of *S. conifera* (Loureiro et al., 2013; Table 1), which is the sister species to the rest of the subsect. *Triplinervium* in the ITS phylogeny (PP = 100, Fig. 1).

Changes in chromosome numbers between sister lineages not entailing important variations in DNA content are attributed to centric fusions or fissions processes (fusions or centric fissions, e.g., Weiss-Schneeweiss & Schneeweiss, 2013). Meanwhile doubling or near-doubling in chromosome number are often assumed to result from tetraploidy events (Jones, 1998; Wood et al., 2009). Here, we observe homogeneous 2C values in Pyrenean taxa (1.3-fold variation, Table 1), but the maximum chromosome number near-triplicates the minimum (64 vs. 26, Table 1). In a recent study, Fishman et al. (2014) point that chromosome number increase by fission has been relatively unexplored and can be difficult to distinguish from polyploidy when gaps in chromosome number are large. This could explain some important changes in chromosome numbers in the species studied not accompanied by relevant genome size variation (Table 1). In any case, such explanation

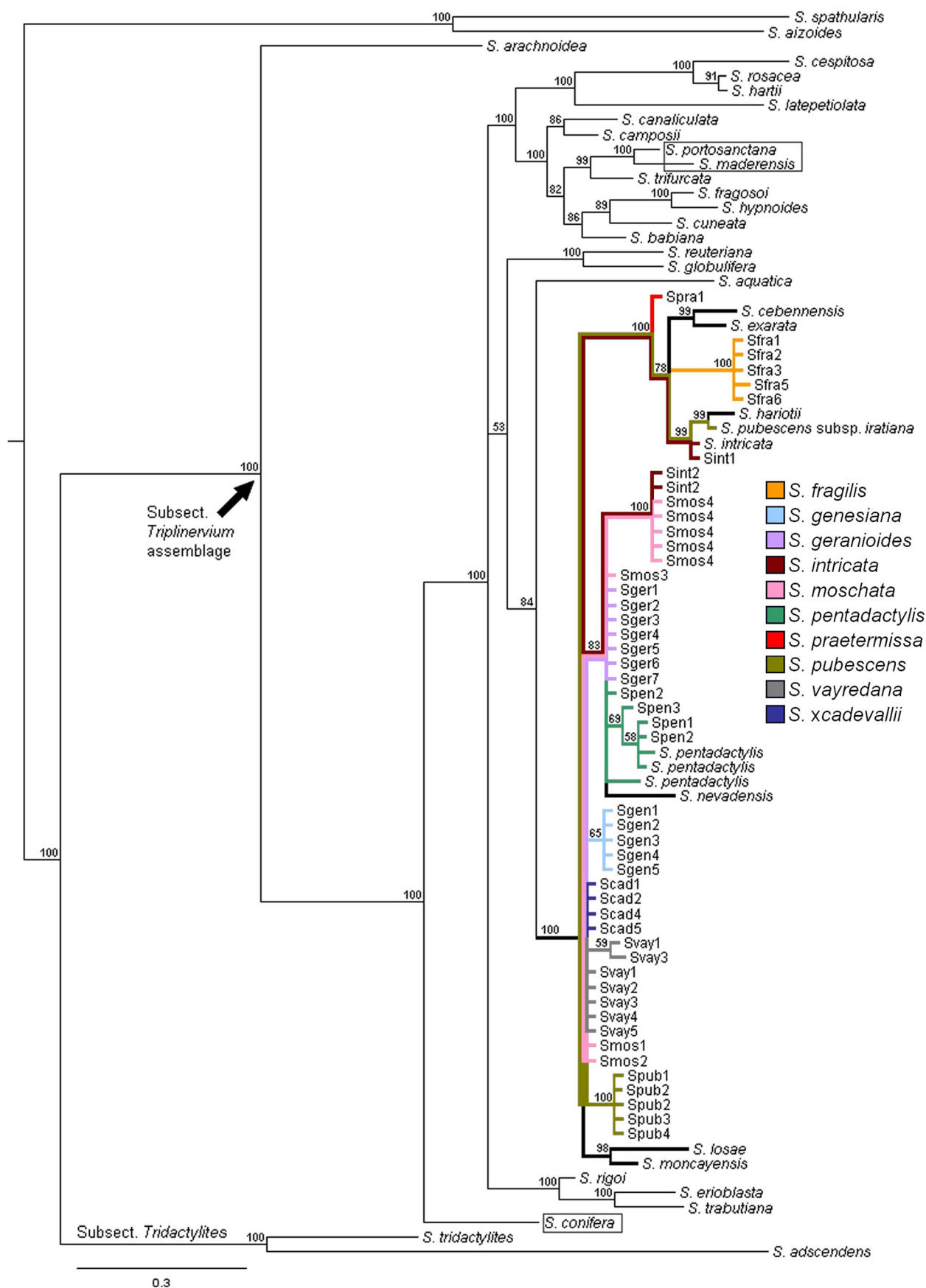


Fig. 1. Continued

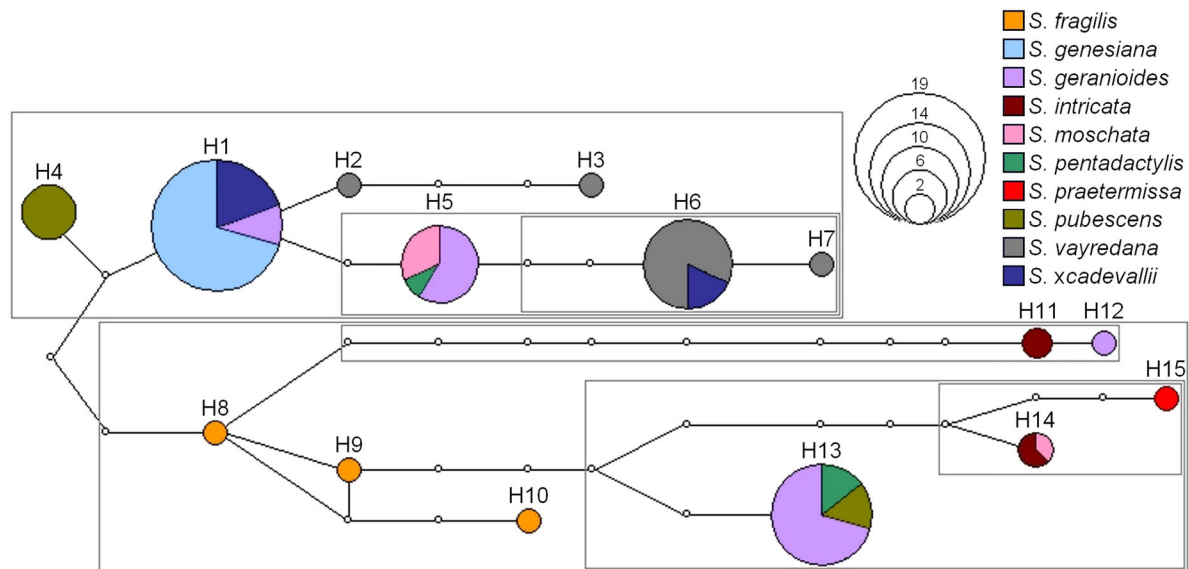


Fig. 2. Haplotype network from three plastid regions (*rpl32-trnL*, *trnS-trnG-trnG*, and *3'trnV-ndhC*). Circle sizes are proportional to haplotype frequencies. Small circles represent single mutational steps. The gray squares correspond to lineages with a PP ≥ 0.95 in the tree obtained by Bayesian inference.

would entail the centric fission of all the chromosomes at least one time, which can be considered a rather dramatic, not highly probable cytogenetic event. Further studies are needed in *Saxifraga* to determine the importance of centric fissions, since it can neither be appreciated in chromosomal preparations (due to the above-mentioned technical difficulties) nor be inferred only with genome size data.

Autopolyploidy also seems to be a prevalent phenomenon in the Saxifragaceae (Soltis et al., 2007, supported by *S. moschata*, this study). In addition to the mentioned *S. moschata* population, we detected increase in DNA content in the Madeiran *Saxifraga* taxa. Colonization of the Madeiran archipelago by this genus appears to have occurred from a Northern-Iberian ancestor in a single event (Vargas et al., 1999). DNA ploidy levels suggest that colonization started in Porto Santo island, where a first autopolyploidization was experienced (*S. portosantana*, 2.92 pg, Table 1), and a second autopolyploidization was experimented in the colonization of Madeira island (*S. maderensis*, 7.52 pg, Table 1). In this case, the increase of ploidy level can be correlated with the polyploid series of *S. granulata* ($R^2 = 0.8544$). Autopolyploidization could have played an important role in the adaptation of *Saxifraga* to the new climatic conditions and lowers altitudes of the Madeiran archipelago in comparison with their Iberian ancestors' habitat.

These results suggest a combination of multiple cytogenetic mechanisms (mainly centric fissions and autopolyploidy) operating in karyotype evolution in this group of *Saxifraga*. All these in concert with other sources of chromosome variation as the hybridization and the B chromosomes

presence (see next subheadings). Nevertheless, we can infer that the ancestor of subsection *Triplinervium* was a diploid, with small DNA amount (2C value about 1.30 pg) and with a basic chromosome number most likely of $x = 11$ as *S. granulata* (Redondo et al., 1996) and the members of the sister subsection *Tridactylites* (Haw.) Gornall (Brochmann et al., 1996; Fig. 1).

Hybrid speciation in Pyrenean *Saxifraga* occurred mostly in homoploidy

Studied Pyrenean taxa form a well-supported clade in ITS Bayesian tree (PP = 100%, Fig. 1), which reinforces that the Pyrenees could have acted as a refuge for these *Saxifraga* species. However, the relationships within the clade remain unclear. Lack of resolution is due in part to MrBayes treatment of polymorphism as uncertainty (Huelsenbeck et al., 2001) so that rDNA loci intragenomic variability cannot be discerned. The short length of most branches (Fig. 1) suggests that these taxa might have arisen recently.

The phylogenetic distance observed between some western Pyrenean specimens (*S. intricata* [Sinti, Appendix I] and *S. pubescens* subsp. *iratiana*, Fig. 1) and the eastern specimens from the same taxa (*S. intricata*: Sint2, Appendix I; and *S. pubescens* subsp. *pubescens*: Spub1, 2, 3, and 4, Table 1) could reveal an hybridization event followed by bidirectional concerted evolution. In the case of *S. pubescens*, the geographical disjunction is related with some morphological differentiation that allows defining the two subspecies (Vargas, 1997). Thus, *S. intricata* and *S. pubescens* have probably arisen from the hybridization between Pyrenean

Fig. 1. Majority rule consensus tree from Bayesian inference based on sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA. The figures above the branches are the posterior probabilities. In box non-Pyrenean species with known genome size data (Table 1). Accession numbers and population code of new samples in Appendix I.

taxa on the one side and a *S. fragilis* ancestor (or a related taxon) on the other side, resulting in species with similar DNA content (Table 1). Interior (ancient) haplotypes in the network support this statement.

Moreover, *S. moschata* seems to have played an important role in Pyrenean *Saxifraga* hybrid speciation. This is supported by the shared ribotypes, its wide distribution, its great morphological polymorphism, and the ease of hybridization with other section congeners (Vargas, 1997). DNA content variation also agrees with a central role of *S. moschata* with the lowest values and *S. fragilis* with one of the highest.

Spontaneous hybrids are frequent in *Saxifraga*, but, at least in subsect. *Triplinervium*, introgression does not occur. Genome size in all specimens of the three hybrid taxa was close to the expected mean of their putative parents (means in Table 1) and proves the utility of these tool to detect hybridization when DNA amount was significantly different between parental taxa (Table 1, see also Garcia et al., 2008). Seed morphology studies and germination assays in *S. ×cadevallii* showed that seeds from hybrid specimens are unviable, because they cannot complete their development. This was also found in *S. ×bubaniana* and *S. ×jeanpertii*. A general pattern was described for this group of *Saxifraga*, in which barriers are formed at the F₂ generation (Vargas & Nieto-Feliner, 1996). Thus, and because pollen seems fertile, hybrids sterility occurs at postzygotic level. No paternal effects were observed in *S. ×cadevallii* specimens' morphology with known haplotype (like Vargas & Nieto-Feliner, 1996 in reciprocal crossings experiment). This discards nucleocytoplasmic incompatibility (Levin, 2003) and points toward other mechanisms as being responsible for hybrid sterility, such as chromosomal rearrangements related with the substantial difference in chromosome number of the parental species (Table 1).

Our DNA content assessments suggest that all measured taxa have same DNA ploidy level (except one *S. moschata* population, Table 1). Therefore, hybrid speciation in Pyrenean *Saxifraga* may have occurred in homoploidy (in the sense that there is no change in the hybrid ploidy level in respect to their parental taxa), but involving taxa that display very different chromosome numbers (range from 26 to 64, Table 1). But hybrid speciation without genome doubling and/or ecological differentiation is difficult to be complete (Soltis & Soltis, 2009), especially if hybrids cannot self-perpetuate, as in our case. We propose that homoploid hybrid speciation has been historically successful, probably due to the own cytological instability of the group, which can help hybrids to become stabilized by chromosomal rearrangements (Grant, 1958). Thus, *Saxifraga* spontaneous hybrids constitute a F₁ generation that rarely would complete the hybrid speciation process. Therefore, we no longer will use specific nomenclatural binomia when referring to them.

Contacts between the Pyrenees and the neighboring Montseny-Guilleries massif

Contacts between a population of *S. geranioides* from the Eastern Pyrenees (Puigmal, Sger7, Appendix I) and those of the morphologically similar taxon *S. genesiana* from Montseny-Guilleries are suspected based on geographic proximity, similar DNA amount, and the presence of the same chloroplast

haplotype (H1, Appendix I). In addition, because Puigmal population contains both haplotypes H1 and H5 (Appendix I), colonization could have occurred in a single or in multiple events, but only a single maternal line (H1 haplotype, Fig. 2) is remaining in *S. genesiana*. Moreover, the high intra- and inter-population variability found in the DNA amounts of *S. geranioides* ($2C = 1.700 \pm 0.135$ pg) and the higher homogeneity in *S. genesiana* ($2C = 1.750 \pm 0.043$ pg) could also reflect phylogeographic patterns in agreement with a bottleneck experienced during Montseny-Guilleries colonization.

The new chromosome number reported for *S. geranioides* ($2n = ca. 44$, Mas de Xaxars et al., 2014) also supports this colonization history. The big difference in chromosome number from previous reports ($2n = ca. 52$, Jones, 1982; Vargas, 1994) could be explained by the presence of B chromosomes, which cannot be discerned from A chromosomes by size as in the case of *S. virginensis* Michx. (Soltis, 1983). In fact, Küpfer (1971) reported B chromosomes in *S. pentadactylis* subsp. *pentadactylis* (Table 1). It is known that B chromosomes could be spontaneously generated in response to new genomic conditions after a hybridization event (Houben et al., 2013) or could be acting as diploidizing agents in some polyploids (Jones & Houben, 2003). As it has been seen in maize (Lamb et al., 2005) and rice (Houben et al., 2013), B chromosomes are enriched with DNA elements that are normally found at or near A chromosome centromeres. Thus, their presence in *Saxifraga* could be attributed to the centric fissions experienced, supporting the above-stated hypothesis to explain dramatic chromosome number changes without DNA much content variation. Finally, B chromosomes could be one of the sources of the intra-specific variation in DNA amounts (Jones et al., 2008) that we observe in *S. geranioides*.

Conclusions

The taxa of *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* endemic to NE Iberian Peninsula appear to be the result of recurrent isolation and hybridization processes and show a great complexity as indicated by numerous cytotaxonomic indicators. Our multiple dataset approach (morphological, hybrid viability, chromosomal, DNA content, molecular) provided significant data to infer how karyological evolution occurred. New genome size data presented in this study prove that all Pyrenean taxa have the same ploidy level and thus, the great chromosome number variability within and between taxa is explained by the conjunction of centric fission processes, B chromosome presence and homoploid hybrid speciation. Autopolyploidy can also occur in some populations (*S. moschata*), but it seems more successful when hybridization is not possible, such as in the case of the Madeiran archipelago and probably has a role in the adaptation of these taxa to the new climatic conditions. In addition, we proved the utility of DNA ploidy estimations by genome size in lineages with small chromosomes and very active dynamic of chromosome number change.

Acknowledgements

This work was subsidized by MICINN (Spanish government; project CGL2010-22234-C02-01 and 02/BOS), AGAUR

(Generalitat de Catalunya, project 2009SGR00439), and Secció de Ciències Biològiques (Institut d'Estudis Catalans). The authors also thank Ismael Sánchez-jiménez for collection assistance, Alastair Plant for improving the English language and Miquel Veny for technical support. GMdX benefited from a predoctoral ADR grant (Universitat de Barcelona), AG-F benefited from a postdoctoral contract from CGL2010-22234-Co2/BOS project.

References

- Alexander MP. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Biotechnic & Histochemistry* 44: 117–122.
- Anderson E, Stebbins GL Jr. 1954. Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8: 378–388.
- Arnold MD. 1997. *Natural hybridization and evolution*. New York: Oxford University Press.
- Avetissian EM. 1950. Simplified method of pollen preparation by acetolysis. *Zhurnal Russkogo Botanicheskogo Obshchestva pri Akademii Nauk* 35: 6–7.
- Bennett MD, Leitch IL. 2012. Plant DNA C-values Database (Release 6.0, Dec. 2012) [online]. Available from <http://data.kew.org/cvalues/> [accessed 6 March 2014].
- Brochmann C, Nilson T, Gabrielsen T. 1996. A classic example of post-glacial allopolyploid speciation re-examined using RAPD markers and nucleotide sequences: *Saxifraga osloensis* (Saxifragaceae). *Symbolae Botanicae Upsaliensis* 31: 75–89.
- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Doležal J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A* 51A: 127–128.
- Doležal J, Binarová P, Lucretti S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum* 31: 113–120.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Favarger C. 1965. Notes de caryologie alpine, IV. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* 88: 15–23.
- Fernández Areces MP, Díaz González TE, Llamas García F, Valencia Barrera RM, Fernández González D, Fombella Blanco MA, Pérez Carro J. 1988. Morfología de las semillas de algunos taxones del género *Saxifraga* L. (Sect. *Dactyloides* Tausch.). *Lagasalia* 15: 263–274.
- Fishman L, Willis JH, Wu CA, Lee YW. 2014. Comparative linkage maps suggest that fission, not polyploidy, underlies near-doubling of chromosome number within monkeyflowers (*Mimulus*; Phrymaceae). *Heredity* 112: 562–568.
- García S, Canela MA, Garnatje T, McArthur ED, Pellicer J, Sanderson SC, Vallès J. 2008. Evolutionary and ecological implications of genome size in the North American endemic sagebrushes and allies (*Artemisia*, Asteraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 94: 631–649.
- Garnatje T, Vallès J, García S, Hidalgo O, Sanz M, Canela MA, Siljak-Yakovlev S. 2004. Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): Karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biology of the Cell* 96: 117–124.
- Grant V. 1958. The regulation of recombination in plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 23: 337–363.
- Grant V. 1981. *Plant speciation*. New York: Columbia University Press.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Houben A, Banaei-Moghaddam A, Klemme S. 2013. Biology and evolution of B chromosomes. In: Greilhuber J, Dolezel J, Wendel JF eds. *Plant genome diversity*. Vienna: Springer. 2: 149–165.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310–2314.
- Jones K. 1982. Reports. In: Moore DM ed. *Flora Europaea check-list and chromosome index*. Cambridge: Cambridge University Press. 76–79.
- Jones K. 1998. Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *Botanical Review* 64: 273–289.
- Jones N, Houben A. 2003. B chromosomes in plants: Escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science* 8: 417–423.
- Jones RN, Viegas W, Houben A. 2008. A century of B chromosomes in plants: So what? *Annals of Botany* 101: 767–775.
- Küpfer P. 1971. Liens genetiques entre les flores alpinenne et pyreneenne. *Annales scientifiques de l'Université de Besançon* 21: 167–185.
- Küpfer P, Rais JR. 1983. Index des nombres chromosomiques des Spermatophytes de la Suisse I. *Botanica Helvetica* 93: 11–25.
- Lamb J, Kato A, Birchler J. 2005. Sequences associated with A chromosome centromeres are present throughout the maize B chromosome. *Chromosoma* 113: 337–349.
- Lepers-Andrzejewski S, Siljak-Yakovlev S, Brown SC, Wong M, Dron M. 2011. Diversity and dynamics of plant genome size: An example of polysomaty from a cytogenetic study of *Tahitian vanilla* (*Vanilla × tahitensis*, Orchidaceae). *American Journal of Botany* 98: 986–997.
- Levin DA. 2003. The cytoplasmic factor in plant speciation. *Systematic Botany* 28: 5–11.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Loureiro J, Castro M, Cerca de Oliveira J, Mota L, Torices R. 2013. Genome size variation and polyploidy incidence in the alpine flora from Spain. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 70: 39–47.
- Luizet MD. 1931. Monographie des hybrides de Saxifrages Dactylites dits Dactyloides. In: Guétrot M ed. *Plantes hybrides de France*. Lille: Imprimerie Marquant. 5–7: 1–313.
- Lysak MA, Lexer C. 2006. Towards the era of comparative evolutionary genomics in Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution* 259: 175–198.
- Marie D, Brown SC. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biological Cell* 78: 41–51.
- Marques I, Nieto-Feliner G, Martins-Loução MA, Fuertes Aguilar J. 2012. Genome size and base composition variation in natural and experimental *Narcissus* (Amaryllidaceae) hybrids. *Annals of Botany* 109: 257–264.
- Mas de Xaxars G, Vallès J, Garnatje T, Mercadé A, Martín J, Barnola P, Vigo J. 2014. Relacions entre diverses espècies de *Saxifraga* dels Pirineus i de les muntanyes Catalàniques. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*. 78: 51–61.
- Redondo N, Horjales M, Brown S, Villaverde C. 1996. Biometric and cytometric study of nuclear DNA within *Saxifraga granulata* L. *Boletín da Sociedade Broteriana, Séries* 2 67: 287–301.

- Rieseberg LH. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359–389.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL. 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142–166.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275–288.
- Simmons MP, Ochoterena H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49: 369–381.
- Soltis DE. 1983. Supernumerary chromosomes in *Saxifraga virginensis* (Saxifragaceae). *American Journal of Botany* 70: 1007–1010.
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, dePamphilis CW, Wall PK, Soltis PS. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* 96: 336–348.
- Soltis DE, Soltis PS, Collier TG, Edgerton ML. 1991. Chloroplast DNA variation within and among genera of the *Heuchera* Group (Saxifragaceae): Evidence for chloroplast transfer and paraphyly. *American Journal of Botany* 78: 1091–1112.
- Soltis DE, Soltis PS, Schemske DW, Hancock JF, Thompson JN, Husband BC, Judd WS. 2007. Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56: 13–30.
- Soltis PS, Soltis DE. 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology* 60: 561–588.
- Suda J, Trávníček P. 2006. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research. *Cytometry Part A* 69A: 273–280.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Vargas P. 1994. Estudios biosistemáticos en el género *Saxifraga*: Serie *Ceratophyllae* (s. l.). Ph.D. Dissertation. Madrid: Universidad Complutense Madrid.
- Vargas P. 1997. *Saxifraga* L. In: Castroviejo S, Lainz M, López González C, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L eds. *Flora Iberica. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid*. 5: 162–242.
- Vargas P. 2000. A phylogenetic study of *Saxifraga* sect. *Saxifraga* (Saxifragaceae) based on nrDNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution* 223: 59–70.
- Vargas P, Morton CM, Jury SL. 1999. Biogeographic patterns in Mediterranean and Macaronesian species of *Saxifraga* (Saxifragaceae) inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. *American Journal of Botany* 86: 724–734.
- Vargas P, Nieto-Feliner G. 1995. Cytotaxonomical study of *Saxifraga* series *Ceratophyllae* s.l. (Saxifragaceae). *Plant Systematics and Evolution* 197: 200–223.
- Vargas P, Nieto-Feliner G. 1996. Artificial hybridization within *Saxifraga pentadactylis* (Saxifragaceae). *Nordic Journal of Botany* 17: 257–266.
- Vega Y, Marques I, Castro S, Loureiro J. 2013. Outcomes of extensive hybridization and introgression in *Epidendrum* (Orchidaceae): Can we rely on species boundaries? *PLoS ONE* 8: e80662.
- Webb DA, Gornall RJ. 1989. *Saxifrages of Europe*. London: Christopher Helm.
- Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss G. 2013. Karyotype diversity and evolutionary trends in angiosperms. In: Greilhuber J, Dolezel J, Wendel JF eds. *Plant genome diversity*. Volume 2. Vienna: Springer. 209–230.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelf D, Sninsky J, White T eds. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press. 315–322.
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 13875–13879.

Appendix I

Voucher information and GenBank accession numbers for samples obtained in this study following format: taxon name, population code, location, ITS accession number (—, missing data). CatM, Catalanidic Mountains; CP, Central Pyrenees; EP, Eastern Pyrenees; MG, Montseny-Guilleries; TS, Catalan Transversal System; WP, Western Pyrenees.

Saxifraga fragilis Schrank, **Sfra1**, TS, El Far (Catalonia, Spain), KJ774137, **Sfra2**, CatM, Sant Sadurní de Noya (Catalonia, Spain), KJ774138, **Sfra3**, CatM, Morella (Spain), KJ774139, **Sfra4**, WP, San Juan de la Peña (Spain), —, **Sfra5**, WP, Peña de Oroel (Spain), KJ774140, **Sfra6**, CatM, Prades mountains (Catalonia, Spain), KJ774141, **Sfra7**, EP, Corberes mountains (France), —; ***S. genesiana*** P. Vargas, **Sgen1**, MG, Sant Hilari Sacalm (Catalonia, Spain), KJ774142, **Sgen2**, MG, Coll de Sabènia (Catalonia, Spain), KJ774143, **Sgen3**, MG, Puig Sacarbassa (Catalonia, Spain), KJ774144, **Sgen4**, MG, Turó Gros (Catalonia, Spain), KJ774145, **Sgen5**, MG, Sot de les Cordes (Catalonia, Spain), KJ774146, **Sgen6**, MG, Sant Miquel de Solterra (Catalonia, Spain), —; ***S. geranioides*** L., **Sger1**, EP, Ulldeter (Catalonia, Spain), KJ774147, **Sger2**, CP, Estany de Tristaina (Andorra), KJ774148, **Sger3**, CP, Estret de l'Estanyó (Andorra), KJ774149, **Sger4**, CP, Cim de l'Estanyó (Andorra), KJ774150, **Sger5**, CP, Estanyet de Besiberri (Catalonia, Spain), KJ774151, **Sger6**, CP, Portella d'Orlu (France), KJ774152, **Sger7**, EP, Puigmal 2 (Catalonia, Spain), KJ774153; ***S. intricata*** Lapeyr., **Sint1**, WP, Baños de Panticosa (Spain), KJ774154, **Sint2**, CP, Coth der Estanh (Catalonia, Spain), KJ774155, KJ774156, **Sint3**, CP, Mont Lude (Catalonia, Spain), —; ***S. maderensis*** D. Don, —; ***S. moschata*** Wulfen, **Smos1**, EP, Puigmal 1 (Catalonia, Spain), KJ774157, **Smos2**, EP, Coll de la Marrana (Catalonia, Spain), KJ774158, **Smos3**, CP, Estany de Besiberri (Catalonia, Spain), KJ774159, **Smos4**, CP, Coll d'Anglos (Catalonia, Spain), KJ774160, KJ774161, KJ774162, KJ774163, KJ774164; ***S. pentadactylis*** Lapeyr. subsp. ***pentadactylis***, **Spen1**, EP, Cim de Bastiments (Catalonia, Spain), KJ774165, **Spen2**, CP, Arcalís (Andorra), KJ774166, KJ774167, **Spen3**, CP, Estret de l'Estanyó (Andorra), KJ774168; ***S. portosanctana*** Boiss., —; ***S. praetermissa*** D. A. Webb, **Spra1**, CP, Estanhó d'Escunhau (Catalonia, Spain), KJ774169; ***S. pubescens*** Pourr. subsp. ***pubescens***, **Spub1**, EP, Núria (Catalonia, Spain), KJ774170, **Spub2**, EP, Ulldeter (Catalonia, Spain), KJ774171, **Spub3**, EP, Puigmal 1 (Catalonia, Spain), KJ774172, **Spub4**, EP, Puigmal 2 (Catalonia, Spain), KJ774173; ***S. vayredana*** Luizet, **Svay1**, MG, Sant Hilari Sacalm (Catalonia, Spain), KJ774174, KJ774175, **Svay2**, MG, Coll de Sabènia (Catalonia, Spain), KJ774176, **Svay3**, MG, Puig Sacarbassa (Catalonia, Spain), KJ774177, KJ774178, **Svay4**, MG, Turó Gros (Catalonia, Spain), KJ774179, **Svay5**, MG, Sot de les Cordes

(Catalonia, Spain), KJ774180; **S. ×bubaniana** Engl. & Irmsch., **Sbub1**, EP, Ulldeter (Catalonia, Spain), —; **S. ×cadevallii** Luizet, **Scad1**, MG, Sant Hilari Sacalm (Catalonia, Spain), KJ774181, **Scad2**, MG, Coll de Sabènia (Catalonia, Spain), KJ774182, **Scad4**, MG, Turó Gros (Catalonia, Spain), KJ774183, **Scad5**, MG, Sot de les Cordes (Catalonia, Spain) KJ774184; **S. ×jeanpertii** Luizet, **Sjea1**, EP, Núria (Catalonia, Spain), —.

GenBank accession numbers of the plastid regions used in this study showed by population and haplotype (*rpl32-trnL*, *trnS-trnG-trnG* and *3'trnV-ndhC*).

Sfra1, H9 (KJ774259, KJ774185, KJ774333); **Sfra2**, —; **Sfra3**, —; **Sfra4**, —; **Sfra5**, H10 (KJ774260, KJ774186, KJ774334), **Sfra6**, H8 (KJ774261, KJ774187, KJ774335); **Sfra7**, —; **Sgen1**, H1 (KJ774262, KJ774188, KJ774336), H1 (KJ774263, KJ774189, KJ774337), H1 (KJ774264, KJ774190, KJ774403); **Sgen2**, H1 (KJ774265, KJ774191, KJ774338), H1 (KJ774266, KJ774192, KJ774339); **Sgen3**, H1 (KJ774267, KJ774193, KJ774340), H1 (KJ774268, KJ774194, KJ774341), H1 (KJ774269, KJ774195, KJ774342), H1 (KJ774270, KJ774196, KJ774343); **Sgen4**, H1 (KJ774271, KJ774197, KJ774344), H1 (KJ774272, KJ774198, KJ774345), H1 (KJ774273, KJ774199, KJ774346); **Sgen5**, H1 (KJ774274, KJ774200, KJ774347); **Sgen6**, —; **Sger1**, H5 (KJ774276, KJ774202, KJ774349), H5 (KJ774277, KJ774203, KJ774350), H13 (KJ774275, KJ774201, KJ774348), H13 (KJ774278, KJ774204, KJ774351), H13 (KJ774279, KJ774205, KJ774352), H13 (KJ774280, KJ774206, KJ774353), H13 (KJ774281, KJ774207, KJ774354); **Sger2**, H5 (KJ774283, KJ774208, KJ774356), H13 (KJ774282, KJ774209, KJ774355), H13 (KJ774284, KJ774210, KJ774404); **Sger3**, H12 (KJ774285, KJ774212, KJ774358), H13 (KJ774286, KJ774211, KJ774357); **Sger4**, H1 (KJ774287, KJ774213, KJ774359); **Sger5**, H13 (KJ774288, KJ774214, KJ774360), H13 (KJ774289, KJ774215, KJ774361); **Sger6**, H5 (KJ774290, KJ774216, KJ774362); **Sger7**, H1 (KJ774292, KJ774217, KJ774363), H5 (KJ774291, KJ774218, KJ774364) H5 (KJ774293, KJ774219, KJ774365); **Sint1**, H14 (KJ774294, KJ774220, KJ774366), H14 (KJ774295, KJ774221, KJ774367); **Sint2**, H11 (KJ774296, KJ774222, KJ774368), H11 (KJ774297, KJ774223, KJ774369); **Sint3**, —; **Sint4**, —; **Smos1**, H5 (KJ774298, KJ774224, KJ774405); **Smos2**, H5 (KJ774299, KJ774225, KJ774370); **Smos3**, —; **Smos4**, H14 (KJ774300, KJ774226, KJ774371); **Spen1**, H13 (KJ774301, KJ774227, KJ774372); **Spen2**, H13 (KJ774302, KJ774228, KJ774373); **Spen3**, H5 (KJ774303, KJ774229, KJ774374); **Spra1**, H15 (KJ774304, KJ774230, KJ774375); **Spub1**, —; **Spub2**, H4 (KJ774305, KJ774231, KJ774376), H4 (KJ774306, KJ774232, KJ774377), H4 (KJ774307233, KJ774, KJ774378), H4 (KJ774308, KJ774234, KJ774379), H4 (KJ774309, KJ774235, KJ774380), H4

(KJ774311, KJ774237, KJ774382), H13 (KJ774310, KJ774236, KJ774381); **Spub3**, H13 (KJ774312, KJ774238, KJ774383); **Spub4**, —; **Svay1**, H6 (KJ774313, KJ774239, KJ774406), H6 (KJ774314, KJ774240, KJ774384), H6 (KJ774315, KJ774241, KJ774385), H6 (KJ774316, KJ774242, KJ774386); **Svay2**, H2 (KJ774317, KJ774243, KJ774387), H6 (KJ774318, KJ774244, KJ774388), H6 (KJ774319, KJ774245, KJ774389); **Svay3**, H3 (KJ774321, KJ774247, KJ774391), H6 (KJ774320, KJ774246, KJ774390), H6 (KJ774322, KJ774248, KJ774392); **Svay4**, H6 (KJ774323, KJ774249, KJ774393), H7 (KJ774324, KJ774250, KJ774394); **Svay5**, —; **Sbub1**, —; **Scad1**, H1 (KJ774327, KJ774253, KJ774397), H6 (KJ774325, KJ774251, KJ774395), H6 (KJ774326, KJ774252, KJ774396), H6 (KJ774328, KJ774254, KJ774398); **Scad2**, H1 (KJ774329, KJ774255, KJ774399); **Scad4**, H1 (KJ774330, KJ774256, KJ774400), H1 (KJ774331, KJ774257, KJ774401); **Scad5**, —; **Sjea1**, H5 (KJ774332, KJ774258, KJ774402).

GenBank accession numbers for ITS sequences published in previous works used in this study.

S. adscendens L., EF028688; **S. aquatica** Lapeyr., AF261161; **S. arachnoidea** Sternb., AF261162; **S. aizoides** L., AF504547; **S. babiana** T. E. Díaz & Fern. Prieto, AJ233879; **S. camposii** Boiss. & Reut., AF261170; **S. canaliculata** Boiss. & Reut., AF261170; **S. cebennensis** Rouy & E. G. Camus, AF261169; **S. cespitosa** L., AF261170; **S. conifera** Coss. & Durieu, AJ233865; **S. cuneata** Willd., AJ233881; **S. erioblasta** Boiss. & Reut., AJ233866; **S. exarata** Vill., AJ233861; **S. fragosoi** Sennen, AJ233867; **S. globulifera** Desf., AJ233874; **S. hariotii** Luiz. & Soulié, AF261181; **S. hartii** D. A. Webb, AF261189; **S. intricata**, AJ133030; **S. latepetiolata** Willk., AF261183; **S. losae** Sennen, AJ133027; **S. maderensis**, AJ233882; **S. moncayensis** D. A. Webb, AJ133028; **S. nevadensis** Boiss., AF261185; **S. pentadactylis**, AJ133031, AY354307, AY354308; **S. portosanctana**, AJ233883; **S. pubescens** subsp. *iratiana* (F.W. Schultz) Engl. & Irmsch., AF261187, AF261188; **S. reuteriana** Boiss., AJ233874; **S. rigoi** Porta, AJ233878; **S. rosacea** Moench, AF261190; **S. spatularis** Brot., KC749988; **S. trabutiana** Engl. & Irmsch., AF482693; **S. tridactylites** L., EF028687; **S. trifurcata** Schrad., AJ233885.

Supplementary Material

The following supplementary material is available online for this article at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jse.12105/supinfo>:

Table S1. Compilation of chromosome counts and their references of taxa from *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* with available DNA content assessment.

Table S1. Compilation of chromosome counts and their references of taxa from *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* with available DNA content assessment.

Taxa	Gametic or somatic chromosome numbers and their references
<i>S. conifera</i> Coss. & Durieu	$2n = 42$ (Hamel, 1973)
<i>S. fragilis</i> Schrank	$2n = 60-66$ (Jones, 1982) $n = 33$ (Vargas & Nieto-Feliner, 1995)
<i>S. genesiana</i> P. Vargas	$n = c. 22$ (Vargas, 1997)
<i>S. geranioides</i> L.	$2n = 32$ (Hamel, 1953) $2n = c. 44$ (Mas de Xaxars et al., submitted) $2n = c. 52$ (Jones, 1982) $n = c. 26$ (Vargas & Nieto-Feliner, 1995)
<i>S. granulata</i> L.	$2n = 22, 44, 52$ (Redondo et al., 1996)
<i>S. intricata</i> Lapeyr.	$2n = 20$ (Hamel, 1953) $n = 16, 2n = c. 32$ (Vargas & Nieto-Feliner, 1995) $n = 17$ (Favarger & Küpfer, 1968; Vivant & Delay, 1980) $2n = 34$ (Jones, 1982)
<i>S. maderensis</i> D. Don	$2n = c. 100$ (Ortega & Navarro, 1977) $2n = c. 108$ (Mas de Xaxars et al., unpublished) $2n = 124$ (Dalgaard, 1991)
<i>S. moschata</i> Wulfen	$n = 10, 12, 13, 14, 22, 23, 24, 26, c.28$ (Küpfer & Rais, 1983) $2n = 22, 24, 26, 28, 32$ (Damboldt, 1968) $2n = 22$ (Dobes et al., 1997) $2n = 24$ (Uhrikova et al., 1983) $2n = 26$ (Tumajanov & Beridze, 1968; Lipert, 2006; Loon & Jong, 1978) $2n = 28, 42, c. 48, c. 56$ (Favarger, 1965)

<i>S. pentadactylis</i> Lapeyr.	$n = 16 + 5B$ (Küpfer, 1971)
subsp. <i>pentadactylis</i>	
<i>S. portosanctana</i> Boiss.	$n = c. 27$ (Vargas & Nieto-Feliner, 1995)
	$2n = c. 60$ (Mas de Xaxars et al., unpublished)
<i>S. pubescens</i> Pourr.	$2n = 26$ (Damboldt & Podlech, 1965)
subsp. <i>pubescens</i>	$n = 14, 2n = 28$ (Küpfer & Favarger, 1967)
	$2n = 28$ (Favarger & Küpfer, 1968)
<i>S. vayredana</i> Luizet	$n = c. 30, c. 31$ (Vargas & Nieto-Feliner, 1995)
	$2n = c. 64$ (Jones, 1982)

References from Table S1

- Daalgard W. 1991.** Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia II. *Willdenowia* 20:139-152.
- Dambolt J. 1968.** Zur Cytotaxonomie der Gattung *Saxifraga* L. III. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 81:43-52.
- Dambolt J, Podlech D. 1965.** Zytotaxonomische Untersuchungen an *Saxifraga*-Sippen der grex *Exarato-moschatae* Engl. & Irmischer. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 77:332-339.
- Dobes C, Hahan B, Morawetz W. 1997.** Chromosomenzahlen zur Gefasspflanzen. Flora Österreichs. *Linzer Biologische Beiträge* 29:5-43.
- Favarger C. 1965.** Notes de caryologie alpine IV. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* 88:5-60.
- Favarger C, Küpfer P. 1968.** Contribution à la cytotaxinomie de la flore alpine des Pyrénées. *Collectanea Botanica (Barcelona)* 7:325-352.
- Hamel JL. 1953.** Contribution à l'étude cytotaxinomique des Saxifragacées. In: *Revue de Cytologie et de Biologie végétales*. Université de Paris 14:113-313.
- Hamel JL. 1973.** Matériaux pour l'étude caryo-taxonomique des Saxifragacées, VIII. *Boletín del Instituto de Estudios Asturianos. Suplemento de Ciencias* 16:176-177.
- Jones K, in Moore DM. 1982.** Flora Europaea. Check-list and chromosome index. Cambridge University Press.
- Küpfer P. 1971.** Liens génétiques entre les flores alpinne et pyrénéenne. *Annales Scientifiques de l'Université de Besançon* 21:167-185.
- Küpfer P, Favarger C. 1967.** Premières prospections caryologiques dans la flore orophile des Pyrénées et de la Sierra Nevada. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Paris* 264:2463-2465.
- Küpfer P, Rais JR. 1983.** Index des nombres chromosomiques des Spermatophytes de la Suisse I. *Botanica Helvetica* 93:11-25.
- Lippert W. 2006.** Chromosomenzahlen von Pflanzen aus Bayern und anderen Gebieten. *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft* 76:85-110.
- Loon Van J, Jong H. 1978.** In: IOPB chromosome number reports LIX. *Taxon* 27:53-61.
- Mas de Xaxars G, Vallès J, Garnatje T, Mercadé A, Martín J, Barnola P, Vigo J. 2015.** Relacions entre diverses espècies de *Saxifraga* dels Pirineus i de les muntanyes Catalánídiques. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*, submitted.
- Ortega J, Navarro B. 1977.** Estudios en la Flora de Macaronesia: Algunos números de cromosomas IV. *Botánica Macaronésica* 4:69-76.
- Tumajanov I, Beridze R. 1968.** A karyological investigation of some representatives of the upper alpine adnival floras of the Great Caucasus (in Russian). *Botanicheskiy Zhurnal* 53:58-68.
- Uhrikova A, Ferakova V, Schwarzova T. 1983.** In: IOPB chromosome number reports LXXX. *Taxon* 32:507.
- Vargas P. 1997.** Otra especie del género *Saxifraga* L. (Saxifragaceae) endémica del macizo del Montseny (Cataluña). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 55:191-195.
- Vargas P, Nieto-Feliner G. 1995.** Cytotaxonomical study of *Saxifraga* series *Ceratophyllae* s.l. (Saxifragaceae). *Plant Systematics and Evolution* 197:209-213.
- Vivant J, Delay J. 1980.** Sur quelques endémiques pyrénéennes. Cytotaxonomie (2e partie). *Bulletin de la Société Botanique de France* 127:493-505.

Relacions entre diverses espècies de *Saxifraga* dels Pirineus i de les muntanyes Catalanídiques

Gemma Mas de Xaxars, Joan Vallès, Teresa Garnatje, Arnau Mercadé, Joan Martín, Pere Barnola, Josep Vigo

Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural, 78: 51-61 (2014)

GEA, FLORA ET FAUNA

Relacions entre diverses espècies de *Saxifraga* dels Pirineus i de les muntanyes Catalanídiques

Gemma Mas de Xaxars Giner*, Joan Vallès Xirau*, Teresa Garnatje Roca**, Arnau Mercadé López***, Joan Martín Villodre*, Pere Barnola Echenique****, Josep Vigo Bonada*****

* Laboratori de Botànica. Unitat associada CSIC. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. Avinguda Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona.

** Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB). Passeig del Migdia s/n, Parc de Montjuïc. 08038 Barcelona.

*** Departament de Biologia Vegetal. Unitat de Botànica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal 643. 08028 Barcelona.

**** C/. Santa Rosa 46. 08470 Sant Celoni.

***** Secció de Ciències Biològiques. Institut d'Estudis Catalans. Carrer del Carme 47. 08001 Barcelona. A/e: jvigo@ub.edu

Rebut: 10.10.2012. Acceptat: 31.05.2014. Publicat: 27.06.2014

Resum

Vam seleccionar vuit espècies de la sèrie *Pentadactyles*, concretament, dues del Montseny-Guilleries (*S. genesiana* i *S. vayredana*), cinc de pirinenques (*S. geranioides*, *S. moschata*, *S. intricata*, *S. pentadactylis* i *S. pubescens*) i una (*S. fragilis*) de comuna als Pirineus i al sistema Catalanídic; com també alguns dels híbrids naturals entre aquestes. Per tal d'esbrinar-ne les relacions, ens hem centrat en quatre aspectes diferents: morfologia de l'aparell vegetatiu i de les flors; morfologia de detall i viabilitat del pol·len i les llavors; quantificació del DNA nuclear i recomptes cromosòmics.

Els resultats mostren que la quantitat de DNA discrimina bé els diferents tàxons entre ells i reflecteix adequadament la condició híbrida de les poblacions reputades com a tals. Els grans de pol·len i les llavors també proporcionen caràcters discriminants.

Pel que fa a la distinció entre *S. geranioides* i *S. genesiana*, el caràcter més decisiu és l'ornamentació de les llavors, les d'aquella solament amb macropapilles, les de *S. genesiana* amb micropapilles i macropapilles. El nombre cromosòmic és el mateix en un i altre tàxon ($2n = c. 44$). Hi ha molts indicis que la planta del Montseny (*S. genesiana*) s'originà de poblacions de *S. geranioides* dels Pirineus orientals.

Paraules clau: *Saxifraga*, Pirineus, Montseny-Guilleries, Cariologia, Hibridació.

Abstract

Relationships between several species of *Saxifraga* from the Pyrenees and the Catalanidic Mountains.

Our study concerns eight species of the section *Pentadactyles*, namely two (*S. genesiana* and *S. vayredana*) endemic of the Montseny-Guilleries massif, five (*S. geranioides*, *S. moschata*, *S. intricata*, *S. pentadactylis* and *S. pubescens*) growing in the Pyrenees, and one (*S. fragilis*) existing in both mountain ranges (Pyrenees and Catalanidic); as well as several natural hybrids between some of these taxa. In order to know the relationships among all them, we take in account vegetative and floral parameters, pollen and seed morphology and viability, nuclear DNA amount and chromosome numbers. The results show DNA content to be conclusive to differentiate all taxa and to detect hybrid populations. Pollen grains and seeds give also discriminative characters.

As regards the distinction between *S. geranioides* and *S. genesiana*, the sole important character is the seed ornamentation, consisting of micropapillae in the first taxon, while of mixed micropapillae and macropapillae in *S. genesiana*. The chromosomal number is the same ($2n = c. 44$) in both taxa. Results suggest that *S. genesiana* derived from a *S. geranioides* population of Eastern Pyrenees

Key words: *Saxifraga*, Pyrenees, Montseny-Guilleries, Karyology, Hybridization.

Introducció

A través d'un programa de recerca iniciat l'any 2010 hem pretès de dilucidar les relacions de parentiu entre diverses espècies de *Saxifraga* L. de la sèrie *Pentadactyles* (Lázaro Ibiza) P. Vargas de les muntanyes Catalanídiques i dels Pirineus; concretament, dues estirps del sistema Montseny-Guilleries (*S. genesiana* P. Vargas i *S. vayredana* Luiz.), una espècie comuna als Pirineus i a les muntanyes Catalanídiques (*S. fragilis* Schrank) i cinc de pirinenques (*S. geranioides* L.

s. str., *S. moschata* Wulf. in Jacq., *S. intricata* Lap., *S. pentadactylis* Lap. i *S. pubescens* Pourr.). I hem analitzat, a més, alguns híbrids naturals entre aquests tàxons, especialment *S. ×cadevallii* Luiz., descrita com a híbrid de *S. genesiana* i *S. vayredana*, que creix també al Montseny. La qüestió immediata que ens esperonà fou d'esbrinar la relació entre *S. genesiana* i *S. geranioides*, morfològicament molt properes, tal vegada vicariants (o potser convergents), i presumiblement sortides d'una mateixa estirp en temps no gaire llunyans. Per això ens hi referim amb més insistència i s'investiga la cita-

ció de *S. geranioides* al Puigsacalm (Villegas, 2002) com a possible pont entre els Pirineus i el Montseny. Les indicacions d'aquesta espècie als mapes d'ORCA i de Biocat (Font, 2013) i la seva inclusió al catàleg de la Garrotxa (Oliver & Font, 2008) responen, però, a una antiga citació de Vayreda (com a *S. geranioides* var. *ladanifera* Engl.) que s'ha de referir en realitat a *S. fragilis*.

Els aspectes que hem estudiat en aquest projecte són:

- a) morfologia detallada de l'aparell vegetatiu i de les flors
- b) mida, ornamentació i viabilitat dels grans de pol·len i de les llavors
- c) quantificació del DNA nuclear
- d) recomptes cromosòmics
- e) seqüenciació de regions del DNA nuclear i cloroplàstic
- f) anàlisi d'haplotips mitjançant la seqüenciació d'altres regions cloroplàstiques

En aquest treball ens centrem en els quatre primers aspectes. Els altres dos (juntament amb una part del tercer) són tractats en un article diferent (vegeu Mas de Xaxars *et al.*, 2014); aquí, si és del cas, en donem simplement notícia resumida o alguna referència concreta.

Material i mètodes

El material emprat per a aquest estudi es va obtenir bàsicament de poblacions naturals de *Saxifraga*. Inicialment vam estudiar 46 poblacions de nou tàxons. Vam recollir mostres completes de les plantes de cada població, algunes de les quals van ser estudiades en fresc, per fer les mesures pertinents i recollir-ne pol·len i llavors, i altres van servir per a preparar plecs d'herbari que foren determinats (d'entrada de manera provisional), i dipositats a l'herbari BCN, del Centre de Documentació de Biodiversitat Vegetal de la Universitat de Barcelona.

La relació i l'origen corresponents a les poblacions estudiades es troben a la taula 1.

Per mesurar la quantitat de DNA i per fer les seqüenciacions, vam recollir, de totes les poblacions (i d'un total de 265 individus), fulles fresques que vam conservar, algunes al frigorífic fins al moment —sempre ben proper a la data de recollecció— de la mesura que se'n va fer per citometria de flux, i algunes altres en gel de sílice fins al moment de la seqüenciació. Com que els resultats inicials de mida del genoma corresponents a *S. geranioides* d'Ulldeter eren un xic incoherents, vam dur a terme un segon mostratge que abastava tota l'àrea de la població i que incloïa una altra espècie (*S. pubescens* subsp. *pubescens*) i l'híbrid d'aquesta amb *S. geranioides* (*S. × bubaniana* Engl. & Irmsch.); i vam marcar els individus per tal d'assegurar la traçabilitat de les dades. També vam recollir-ne llavors, per tal de fer-les germinar en placa i obtenir puntes de rels per dur a terme els recomptes cromosòmics.

Pel que fa a la morfologia de detall, els nostres estudis afecten *S. geranioides* i els tres tàxons del sistema Montseny-Guilleries i se centren en les mides de les flors i en l'aparell

vegetatiu. Vam prendre diverses mesures florals de tres poblacions de *S. geranioides*, de cinc de *S. genesiana* i d'una de *S. vayredana*; i vam analitzar també les dimensions i la forma de les fulles. Per a cada població es mesuraren cinc individus, concretament cinc flors per individu.

Quant als grans de pol·len, per a l'estudi morfològic hem aplicat el micromètode qualitatiu d'acetòlisi d'Avetissian (1950); i n'hem comprovat la viabilitat mitjançant el mètode d'Alexander (1969). El nombre de poblacions i d'individus mesurats, així com les mitjanes dels diàmetres per tàxon, s'indiquen a la taula 3. El tractament i l'observació de la superfície del pol·len i les granes amb el microscopi electrònic de rastreig (MER) es va dur a terme en els Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona.

Per a la quantificació del DNA hem aplicat tècniques d'extracció (Doležel *et al.*, 1989) i d'anàlisi de fluorescència mitjançant citometria de flux, seguint el protocol descrit a Garnatje *et al.* (2004). Es mesuraren dues rèpliques de cadascun dels individus recollits. En relació amb els recomptes cromosòmics, ja ha estat documentat (Redondo & Horjales, 1989; Vargas & Nieto-Feliner, 1995) que en aquest gènere resulta difícil d'obtenir bones preparacions cromosòmiques. Les llavors es van desar a 4 °C (d'1 a 2 anys) fins al moment de posar-les a germinar en una cambra en placa de Petri amb paper humit. Les condicions del germinador han estat d'alternança claror/foscor cada 12 h, a una temperatura constant de 20 °C. Després de diversos intents infructuosos, les últimes proves que hem fet, seguint el mètode descrit a Wakabayashi & Ohba (1988), a partir d'arrels de llavors germinades en plaques de Petri, pretractades amb colquicina i fixades amb una barreja d'etanol absolut, àcid acètic glacial i cloroform, i després d'hidròlisi amb HCl a 60 °C durant 30 segons, han donat més bons resultats. Finalment s'obtingué, a part d'altres que permetien comptar els cromosomes, però no eren perfectes per a ser publicades, una bona placa metafàsica de la població de *S. genesiana* del Turó Gros i tres de la població de *S. geranioides* d'Ulldeter.

Resultats i discussió

Morfologia detallada

Pel que fa als paràmetres florals del grup *S. geranioides-genesiana-vayredana*, tot i que les mitjanes són significativament diferents, les distàncies entre *S. genesiana* i *S. geranioides* són petites i no permeten discriminar amb seguretat un tàxon de l'altre. Sí que resulten evidents, però, les diferències entre aquestes dues i *S. vayredana*, com també les característiques intermèdies de *S. × cadevallii* respecte dels seus tàxons parentals en la majoria de mesures florals (Fig. 1).

Mentre que els valors de mida floral obtinguts per a *S. geranioides* i *S. vayredana* es corresponen amb els que signa *Flora iberica* (Vargas, 1997b), els que hem obtingut per a *S. genesiana* no coincideixen amb els de la descripció de l'espècie (Vargas, 1997a), sinó que són palesament més grans (vegeu la taula 2).

Taula 1. Origen del material estudiat.

Codi	Tàxon	Localitat, recol·lectors i data
Ssub1	<i>S. ×bubaniana</i>	Catalunya: Ripollès, Setcases, prop de l'aparcament sota el refugi d'Ulldeter, <i>Mas de Xaxars i Sánchez-Jiménez</i> , 21 juliol 2010
Scad1	<i>S. ×cadevallii</i>	Catalunya: les Guilleries, Sant Hilari Sacalm, vessant NE del Turó de Faig Verd, <i>Garnatje, Mercadé i Sánchez-Jiménez</i> , 2 juny 2010
Scad2	<i>S. ×cadevallii</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Coll Sabènia, <i>Barnola, Pié, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Scad4	<i>S. ×cadevallii</i>	Catalunya: Montseny, Turó Gros, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Scad5	<i>S. ×cadevallii</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Sot de les Cordes, <i>Barnola, Pié i Sánchez-Jiménez</i> , 14 juny 2010
Sfra1	<i>S. fragilis</i>	Catalunya: les Guilleries, Susqueda, Mare de Déu del Far, <i>Garnatje, Mercadé i Sánchez-Jiménez</i> , 2 juny 2010
Sfra2	<i>S. fragilis</i>	Catalunya: Vallès Occidental, cingles de Sant Sadurn de Gallifa, Serrat Punxegut, <i>Mercadé</i> , 1 juny 2010
Sfra3	<i>S. fragilis</i>	País Valencià: Ports de Morella, castell de Morella, <i>Pérez-Haase i Sánchez-Jiménez</i> , 12 juny 2010
Sfra4	<i>S. fragilis</i>	Aragó: embassament de San Juan de la Peña, a prop de la resclosa, <i>Garnatje, Vallès i Villar</i> , 15 juny 2010
Sfra5	<i>S. fragilis</i>	Aragó: Jaca, Peña de Oroel, parador d'Oroel, <i>Garnatje, Vallès i Villar</i> , 15 juny 2010
Sfra6	<i>S. fragilis</i>	Catalunya: muntanyes de Prades, vall de Castellfollit, <i>Vigo i Masalles</i> , 21 juny 2010
Sfra7	<i>S. fragilis</i>	Occitània: Aude, les Corberes, roques calcàries sobre Lo Caunilh, <i>Cauwet-Marc i Vallès</i> , 26 juny 2010
Sgen1	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: les Guilleries, Sant Hilari Sacalm, vessant NE del Turó de Faig Verd, <i>Garnatje, Mercadé i Sánchez-Jiménez</i> , 2 juny 2010
Sgen2	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, coll Sabènia, <i>Barnola, Pié, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Sgen3	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: Montseny, Puig Sacarbassa, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Sgen4	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: Montseny, Turó Gros, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Sgen5	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Sot de les Cordes, <i>Barnola, Pié i Sánchez-Jiménez</i> , 14 juny 2010
Sgen6	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: les Guilleries, Osor, Sant Miquel de Solterra, <i>Pérez-Haase</i> , 4 juliol 2011
Sger1	<i>S. geranioides</i>	Catalunya: Ripollès, carretera de Setcases a Vallter-2000, camí del refugi, part inferior (Ulldeter), <i>Barnola</i> , 30 juny 2010
Sger2	<i>S. geranioides</i>	Andorra: Ordino, estany del Mig de Tristaina, <i>Carrillo i Ferré</i> , 8 juliol 2010
Sger3	<i>S. geranioides</i>	Andorra: Ordino, Estret de l'Estanyó, pujant a l'Estanyó, <i>Batriu, Mercadé i Pérez-Haase</i> , 8 juliol 2010
Sger4	<i>S. geranioides</i>	Andorra: Ordino, Estanyó, cap al cim, <i>Batriu, Mercadé i Pérez-Haase</i> , 8 juliol 2010
Sger5	<i>S. geranioides</i>	Catalunya: Alta Ribagorça, Estanyet (estany superior) de Besiberri, <i>Solé i Talavera</i> , 13 juliol 2010
Sger6	<i>S. geranioides</i>	Occitània: Arieja, Portella d'Orlu, <i>Blanco Moreno, Pérez-Haase i Petit</i> , 11 juliol 2010
Sger7	<i>S. geranioides</i>	Catalunya: Ripollès, coll de les Clotes del Puigmal, <i>Vigo, Barnola, Mercadé i Tenas</i> , 21 juliol 2010
Sint1	<i>S. intricata</i>	Aragó: Baños de Panticosa, <i>Garnatje, Vallès i Villar</i> , 15 juny 2010
Sint2	<i>S. intricata</i>	Catalunya: Vall d'Aran, Coth der Estanh, <i>Vallès, Vigo i Villar</i> , 6 juliol 2010
Sint3	<i>S. intricata</i>	Catalunya: Vall d'Aran, Mont Lude, <i>Villar</i> , 6 juliol 2010
Sint4	<i>S. intricata</i>	Catalunya: Vall d'Aran, Estanh Long de Vilamòs, <i>Vallès, Vigo i Villar</i> , 6 juliol 2010
Sjea1	<i>S. ×jeanpertii</i>	Catalunya: Ripollès, Núria, coma de les Molles, <i>Barnola i Vigo</i> , 30 juny 2010
Smos1	<i>S. moschata</i>	Catalunya: Ripollès, Pas dels Lladres, <i>Vigo, Barnola, Mercadé i Tenas</i> , 21 juliol 2010
Smos2	<i>S. moschata</i>	Catalunya: Ripollès, entre el coll de la Marrana i el cim de Bastiments, <i>Mas de Xaxars i Sánchez-Jiménez</i> , 21 juliol 2010
Smos3	<i>S. moschata</i>	Catalunya: Alta Ribagorça, tarteres vora l'Estany (inferior) de Besiberri, <i>Simon, Vallès, Espuña, Garcia, Jácome, Marimon, Quaglia, Rosique, Solé i Talavera</i> , 13 juliol 2010
Smos4	<i>S. moschata</i>	Aragó: Alta Ribagorça, roques vora el camí del coll d'Anglos des de l'embassament de Llauset, <i>Simon, Vallès, Espuña, Garcia, Jácome, Marimon, Quaglia, Rosique, Solé i Talavera</i> , 14 juliol 2010
Spen4	<i>S. pentadactylis</i>	Catalunya: Ripollès, cim de Bastiments, <i>Mas de Xaxars i Sánchez-Jiménez</i> , 21 juliol 2010
Spen2	<i>S. pentadactylis</i>	Andorra: Ordino, vora les instal·lacions d'esquí d'Arcalis, <i>Vallès i Vigo</i> , 8 juliol 2010
Spen3	<i>S. pentadactylis</i>	Andorra: Ordino, Estret de l'Estanyó, <i>Batriu, Mercadé i Pérez-Haase</i> , 8 juliol 2010
Spub1	<i>S. pubescens</i> subsp. <i>pubescens</i>	Catalunya: Ripollès, Núria, Creu d'en Riba, <i>Barnola</i> , 25 juny 2010
Spub2	<i>S. pubescens</i> subsp. <i>pubescens</i>	Catalunya: Ripollès, Setcases, prop de l'aparcament sota el refugi d'Ulldeter, <i>Barnola, Garnatje, Mas de Xaxars, Mercadé, Sánchez-Jiménez, Vallès i Vigo</i> , 29 juny 2011
Spub3	<i>S. pubescens</i> subsp. <i>pubescens</i>	Catalunya: Ripollès, Pas dels Lladres, <i>Vigo, Barnola, Mercadé i Tenas</i> , 21 juliol 2010
Spub4	<i>S. pubescens</i> subsp. <i>pubescens</i>	Catalunya: Ripollès, sobre el coll de les Clotes del Puigmal, <i>Vigo, Barnola, Mercadé i Tenas</i> , 21 juliol 2010
Svay1	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: les Guilleries, Sant Hilari Sacalm, vessant NE del Turó de Faig Verd, <i>Garnatje, Mercadé i Sánchez-Jiménez</i> , 2 juny 2010
Svay2	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Coll Sabènia, <i>Barnola, Pié, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Svay3	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: Montseny, Puig Sacarbassa, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Svay4	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: Montseny, Turó Gros, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Svay5	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Sot de les Cordes, <i>Barnola, Pié i Sánchez-Jiménez</i> , 14 juny 2010

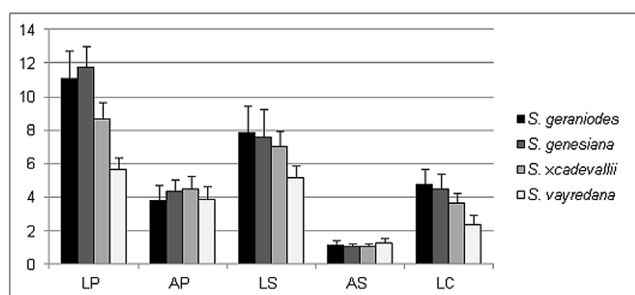


Figura 1. Mitjanes per tàxon (en mil·límetres) dels paràmetres florals mesurats, basades en la mitjana marginal poblacional modificada. LP: longitud dels pètals; AP: amplada dels pètals; LS: longitud de les dents dels sèpals; AS: amplada de les dents dels sèpals; LC: longitud del calze.

Taula 2. Mides (en mil·límetres) dels pètals i les llavors de *S. geranioides* (Sger) i *S. genesiana* (Sgen) segons diverses flores i segons els nostres resultats. Nota: la Flora dels Països Catalans (Bolòs & Vigo, 1984) considera ambdós tàxons (Sger i Sgen) com a *S. geranioides* i la Flora manual dels Països Catalans (Bolòs *et al.*, 2005) com a subespècies de *S. geranioides*. Vegeu la taula 1 per als codis dels tàxons.

	Pètals				Llavors			
	Llargada		Amplada		Llargada		Amplada	
	Sger	Sgen	Sger	Sgen	Sger	Sgen	Sger	Sgen
Flora iberica	(7)9-12(16)	(6)7-9(11)	(2)3-4(6)	2-3	0,60-0,80	0,55-0,65	0,35-0,45	0,35-0,45
Flora PC	(87)910-14(816)9		(2)3-4(6)		(sense dades)			
Flora manual PC	7-12(16)	3*-10(13)	(sense dades)	0,60-0,80	0,50-0,66	(sense dades)		
Dades de l'estudi	(7)9-13(14)	(8)10-13(14)	(2)3-4(6)	(3)4-5(6)	0,58-0,74	0,53-0,76	0,25-0,42	0,26-0,44

* Longitud mínima inversemblant, que si bé és la que consta a la Flora manual dels Països Catalans (Bolòs *et al.*, 2005), respon probablement a una errada d'impremta; hauria de ser un 6.

Malgrat que la mida de les peces florals sembla disminuir amb l'altitud, la correlació entre ambdues variables no es mostra significativa ($p > 0,05$).

Les dimensions i la forma de les fulles també mostren una variabilitat força notable dintre de cada tàxon (Fig. 2). Les de *S. vayredana* són clarament diferents de les altres i s'ajusten a les descripcions morfològiques usals (vegeu, per exemple, Bolòs & Vigo, 1984 o Vargas, 1997b); com també les de *S. ×cadevallii* (Luizet, 1931), que resulten clarament intermèdies entre les dels seus progenitors. Entre *S. geranioides* i *S. genesiana*, en canvi, no vam trobar diferències decisives, llevat que en aquesta darrera apareixen més sovint (sobretot en algun exemplar de les Guillerries i en un individu que es feia dins la fageda del Matagalls) fulles no tan profundament dividides i amb els lòbuls no tan aguts, un xic acostades a les que descriu i dibuixa l'autor del tàxon (Vargas, 1997a).

Sense especificar mesures concretes, vegeu una mostra representativa del fullatge d'aquests quatre tàxons en la figura 2. Les fulles representades són les homòlogues de cada tàxon (sempre de la roseta basal).

Cal dir que dues de les plàntules procedents de la germinació de llavors de *S. genesiana* mostraven inicialment una morfologia semblant a la de l'exemplar que havia obtingut Vargas (1997a) pel mateix procediment i que il·lustra la descripció de la nova espècie. Podia tractar-se d'una modificació induïda per les condicions de desenvolupament d'aquests individus? Per tal de comprovar-ho, a mitjan abril vam trasplantar els exemplars «anòmals» en una localitat monsignàtica sotmesa a un ambient natural estàndard, on vam sembrar-hi ensemes grans de la mateixa planta mare. Al cap de dos mesos i mig (a final de juny) els individus trasplantats havien produït fulles bon xic semblants a les dels individus espontanis (vegeu la figura 3).

Quant als grans de pol·len i les llavors, ens interessava sobretot discriminar entre *S. geranioides* i les estirps del Montseny (*S. genesiana* i *S. vayredana*, i el seu híbrid *S. ×cadevallii*).

Grans de pol·len

Pel que fa a les mesures dels grans de pol·len (Taula 3), hem trobat diferències significatives en el volum entre la ma-

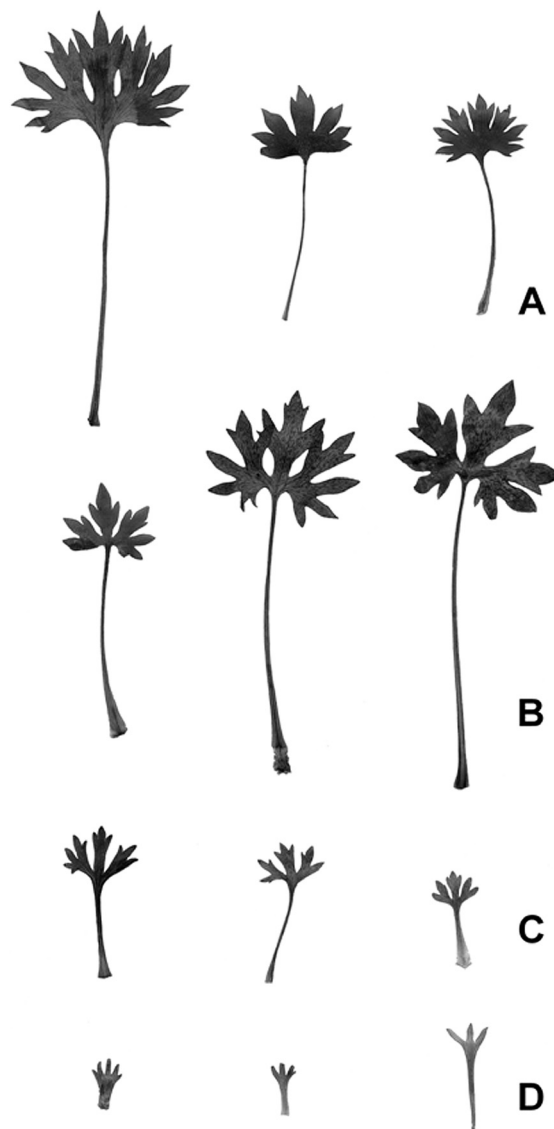


Figura 2. Fulles de *Saxifraga geranioides* (A), *S. genesiana* (B), *S. ×cadevallii* (C) i *S. vayredana* (D).

Taula 3. Mesures de pol·len per tàxon amb la seva desviació estàndard (SD). S'indica el nombre de poblacions estudiades i el nombre total de grans mesurades. D1 = Diàmetre polar; D2 = Diàmetre equatorial. Vol = Volum estimat. Vegeu la taula 1 per als codis dels tàxons.

Codi de tàxon	Nombre de poblacions	Nombre de grans	D1 (μm)	SD D1	D2 (μm)	SD D2	VOL (μm^3)	SD VOL
Scad	4	120	24,66	0,19	18,59	0,16	4553	102,8
Sfra	5	150	28,35	0,17	20,53	0,14	6497	92
Sgen	5	150	26,56	0,17	19,28	0,14	5371	92
Sger	6	210	26,09	0,15	19,29	0,12	5201	80,4
Sint	1	60	20,87	0,27	17,5	0,22	3412	145,5
Sjea	1	60	19,18	0,27	14,96	0,22	2292	145,5
Smos	3	90	23,52	0,22	19	0,18	4565	118,8
Smos4	1	60	26,21	0,27	20,07	0,22	5570	145,5
Spen	2	60	21,92	0,27	16,86	0,22	3419	145,5
Spub	3	90	25,28	0,22	18,38	0,18	4578	118,8
Svay	5	138	23,45	0,18	17,6	0,15	3987	97,9

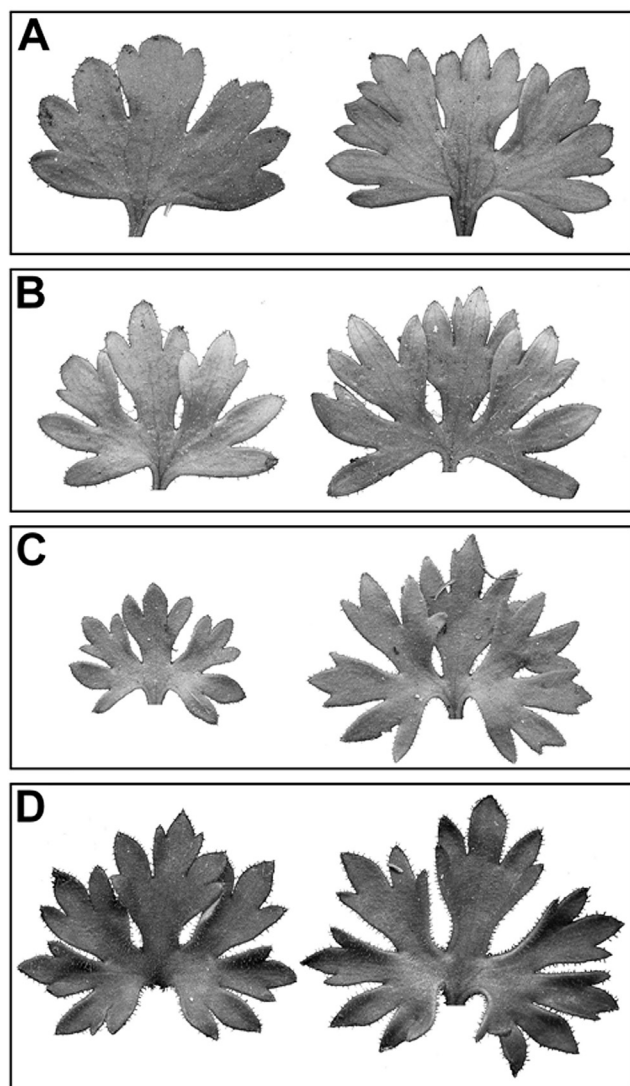


Figura 3. Fulles d'exemplars de *Saxifraga genesiana*. A i B: fulles (dues per individu) dels dos exemplars trasplantats al Turó Gros (Montseny) el 13 d'abril de 2012. C: fulles (una per individu) dels mateixos exemplars, recollides el 23 de juny de 2012. D: fulles d'un exemplar espontani, recollides al mateix indret el 13 d'abril de 2012.

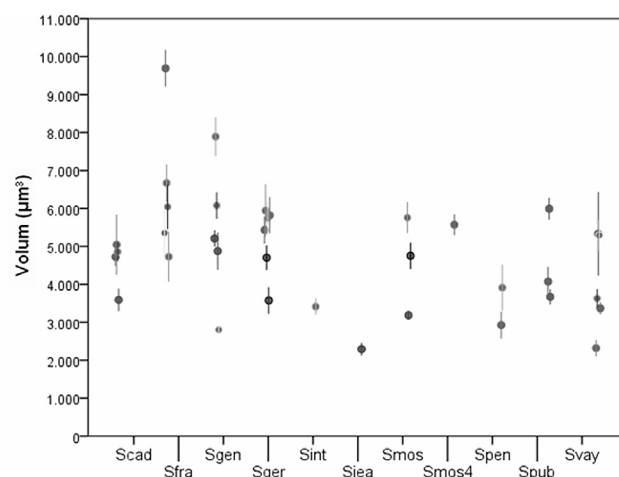


Figura 4. Volum estimat dels grans de pol·len en μm^3 per tàxon. Cada punt representa una mitjana poblacional amb les seves barres d'error (interval de confiança: 95 %). Vegeu la taula 1 per als codis dels tàxons.

joria d'aquests tàxons ($p = 0,000$). No obstant, la forta correlació positiva entre els dos diàmetres (polar i equatorial) en el conjunt dels grans de pol·len mesurats (coeficient de correlació d'Spearman = 0,656, $p = 0,000$) indica que, en general, es mantenen les proporcions. També s'ha detectat una gran variabilitat interpoblacional (Fig. 4), amb la qual cosa no seria possible assignar un gra de pol·len a un únic tàxon amb una elevada confiança només per les seves mesures. L'ornamentació de l'exina observada al microscopi electrònic de rastreig tampoc no dona cap tret distintiu (Fig. 5).

És remarcable, però, que el pol·len de totes les poblacions estudiades ha resultat altament viable (més del 90 %), fins i tot en el cas de l'híbrid esmentat i en els de poblacions híbrides entre altres tàxons mostrejades per nosaltres. A més, la morfometria pol·linica de *S. ×cavedallii* tampoc no dona indicis de l'origen híbrid d'aquest tàxon, ja que no hi apareixen grans de pol·len deformats (la qual cosa és lògica atesa l'elevada taxa de viabilitat que hem vist que tenien) i, a part d'això, no s'observa irregularitat ni bimodalitat en les mides dels grans, fets que sovint es donen en híbrids.

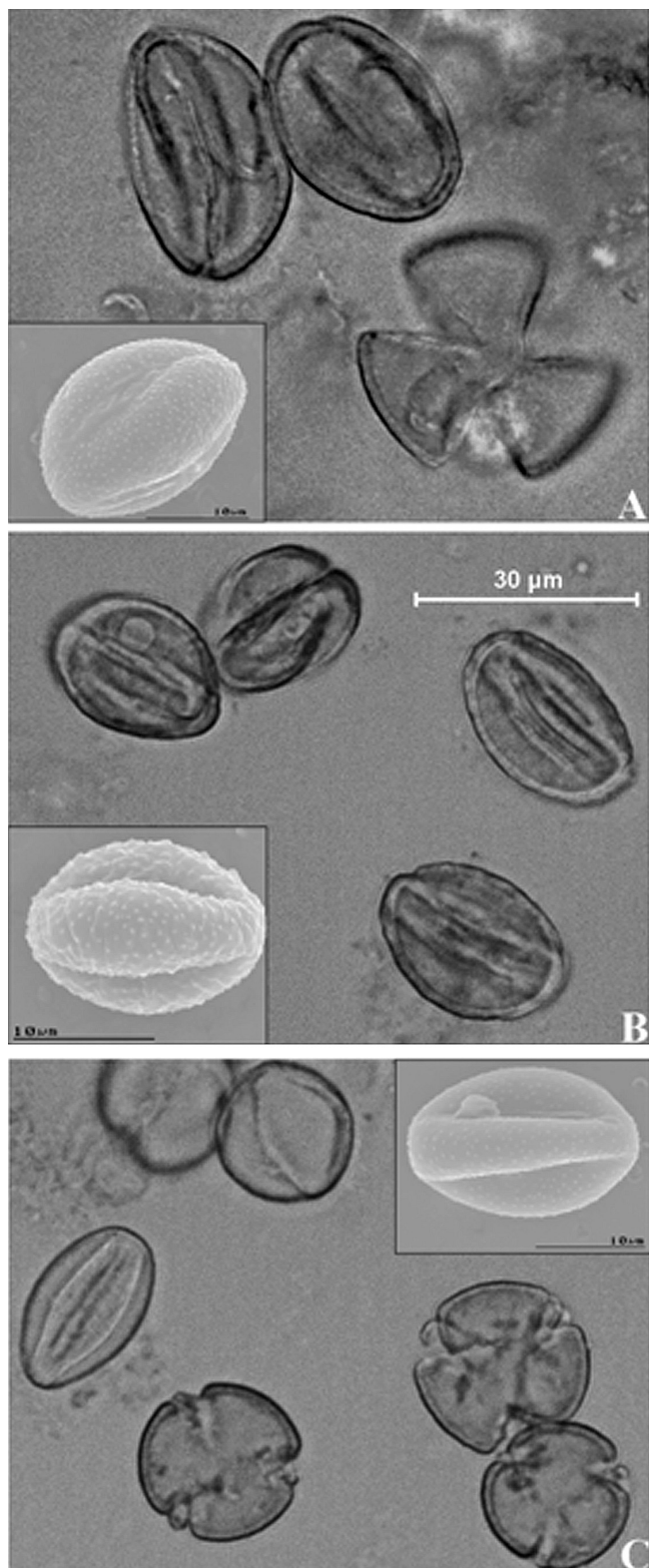


Figura 5. Fotografies de pol·len al microscopi òptic i al microscopi electrònic de rastreig (MER) de la localitat del Turó Grós; A: *S. genesiana*, B: *S. xcadvallii*, C: *S. vayredana*. L'escala és la mateixa per a les tres imatges del microscopi òptic.

Se sospitava de fa temps (Vargas, 1997a) que *S. xcadvallii* no es retroencruava amb cap dels seus progenitors i les quantitats de DNA ho han confirmat (vegeu el subapartat següent). Nosaltres hem comprovat també que *S. xcadvallii* és estèril per algun mecanisme postzigòtic —atès que el pol·len és fèrtil—, que faria que les llavors fossin, totes o la gran majoria, inviables (vegeu Mas de Xaxars *et al.*, 2014).

Llavors

Les mides de les llavors tampoc no són decisives en el cas de *S. geranioides* i *S. genesiana* (Taula 2). En canvi, hi ha una diferència ben neta en l'ornamentació secundària o microornamentació (Vargas, 1997a i aquest estudi), és a dir, el relleu que presenta l'episperma. Aquesta microornamentació comporta tres menes de papil·les. Hom troba: 1) micropapil·les, de longitud inferior a 10 µm i 2) macropapil·les, de longitud superior a 15 µm. Les macropapil·les se subdivideixen, al seu torn, en dos subtipus: a) les més llargues que amples, clarament diferenciables, i b) les més amples que llargues, no tan netament diferenciables (Fernández Areces *et al.*, 1988). En les llavors de *S. vayredana* s'hi barregen micropapil·les i macropapil·les de tipus a, *S. geranioides* presenta únicament micropapil·les, mentre que *S. genesiana* té micropapil·les barrejades amb macropapil·les del tipus b (Fig. 6).

Vista l'ornamentació tan diferent de les granes de *S. genesiana* i les de *S. vayredana*, resultava interessant d'observar l'ornamentació de l'híbrid *S. xcadvallii*. Vam comprovar, però, que no tenen ornamentació definible (Fig. 7), cosa que es trobà també en un altre tàxon híbrid (*S. xsomeana* Fern. Prieto & T.E. Díaz, Fernández Areces *et al.*, 1988). L'explicació és que les granes de l'híbrid no arriben a madurar (o, si algunes ho fan, nosaltres no les vam pas detectar).

La microornamentació és un caràcter important en el gènere *Saxifraga* (Kaplan, 1976), tal com queda reflectit en aquest cas. De totes maneres se sap que algunes espècies produeixen ensembles granes solament amb micropapil·les i granes amb ambdós tipus d'ornamentació, de vegades fins i tot dins d'una mateixa població (Fernández Areces *et al.*, 1988).

Assenyalarem que, en el procediment de germinació de les llavors previ als estudis cariològics, en el cas de *S. genesiana* van germinar-ne més del 60 %; per contra, granes d'una de les mateixes poblacions, després de passar un parell de dies al congelador, van donar solament un 13 % de germinació. En *S. geranioides*, la germinació va ser coincident, d'un 45 %, per a ambdós tractaments. En el cas de *S. vayredana*, la germinació ha estat molt baixa (19 %), probablement perquè la majoria de llavors no eren prou madures. De *S. xcadvallii*, no ha germinat cap llavor (vegeu comentaris anteriors sobre l'esterilitat d'aquest tàxon).

Quantificació del DNA nuclear

Els resultats complets d'aquesta anàlisi, concernents a tots els tàxons estudiats, poden ser consultats a Mas de Xaxars *et al.* (2014).

A la figura 8 presentem les dades corresponents solament a *S. geranioides* i *S. genesiana*. Els cinc individus mostre-

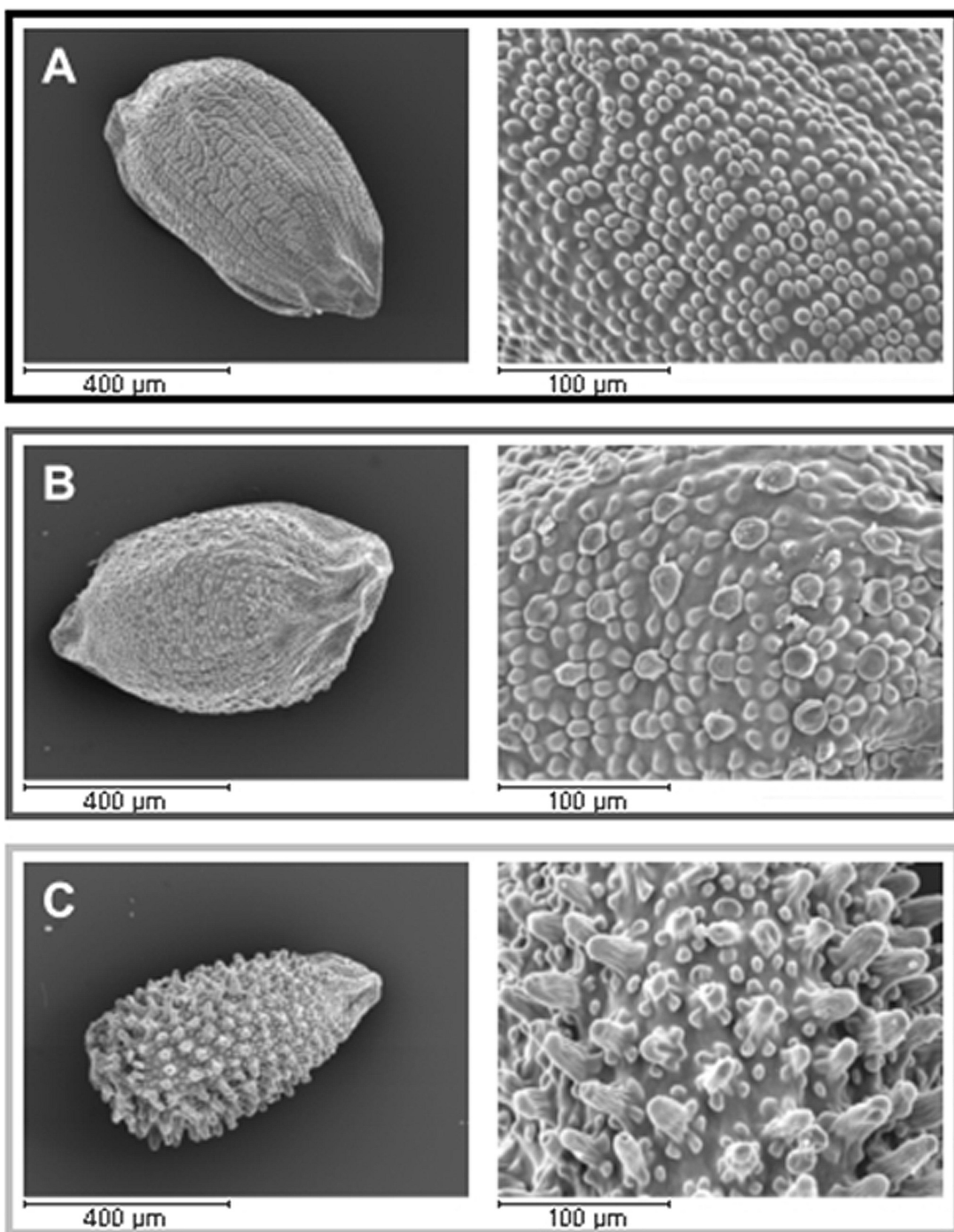


Figura 6. Microornamentació de les granes, observada al MER. A, *S. geranioides* d'Ulldeter. B, *S. genesiana* del Turó Gros. C, *S. vayredana* del Turó Gros.

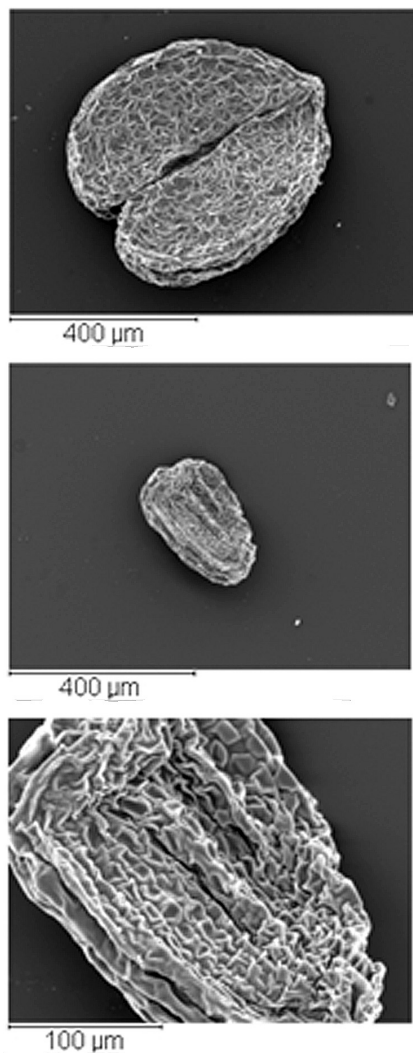


Figura 7. Microornamentació de les granes de *S. x cadevallii* de la localitat del Coll de Sabènia, a diferents augments al MER.

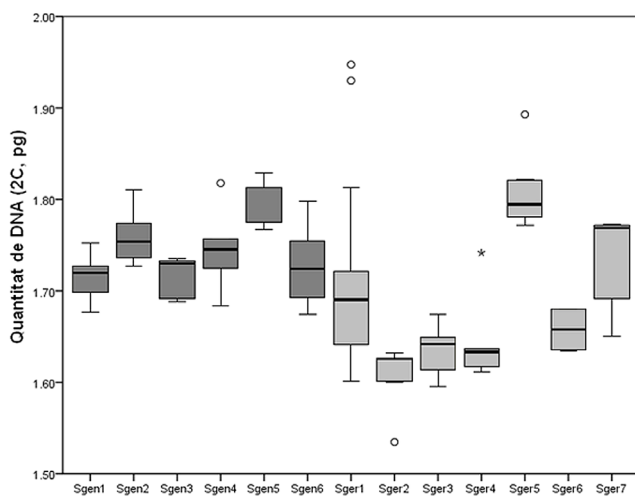


Figura 8. Valors de mida del genoma (2C, pg) amb desviació estàndard (barres d'error) per a poblacions de *Saxifraga genesiana* i *S. geranioides*. Els codis dels tàxons (en les abscisses) són idèntics als que figuren en la taula 1.

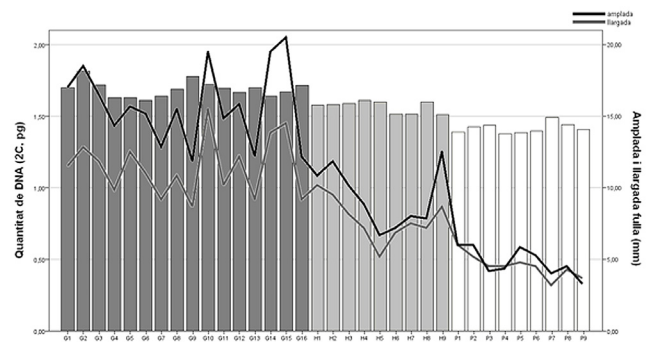


Figura 9. Valors de mida del genoma (2C, pg; barres) i d'amplada i llargada de les seves fulles (mitjana de tres fulles, en mm; línies) dels individus mostrejats a Ulldeter (G = *S. geranioides*, H = *S. x bubaniana*, P = *S. pubescens* subsp. *pubescens*).

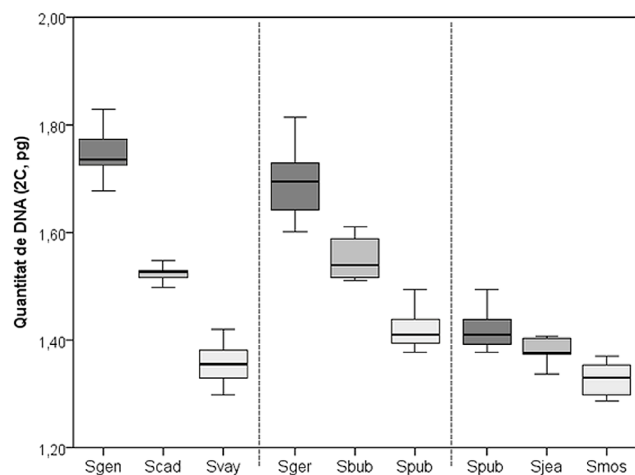


Figura 10. Relació entre les mides del genoma (2C, pg) dels tàxons híbrids trobats i les dels tàxons parentals corresponents. Vegeu la taula 1 per als codis dels tàxons.

jats inicialment a la població de *S. geranioides* d'Ulldeter (Sger1) donaren uns valors de 2C anormalment elevats, en especial pel que fa a un individu amb 2,46 pg (un increment de quantitat al voltant del 50 % respecte a la mitjana de l'espècie). A la vista d'aquests resultats vam decidir d'iniciar un estudi exhaustiu de les poblacions que conviuen en la localitat d'Ulldeter (*S. geranioides*, *S. pubescens* subsp. *pubescens* i el seu híbrid *S. x bubaniana*), seguint el procediment explicat en l'apartat de material i mètodes. Vam trobar, novament, força variabilitat en la quantitat de DNA nuclear, però els valors detectats no foren en cap cas tan elevats com els obtinguts amb el material de la primera recollecció. Aquests es mostren a la figura 9, juntament amb les mesures mitjanes d'amplada i llargada de les fulles dels espècimens.

Pel que fa a *S. geranioides*, traient els casos extrems (vegeu la figura 8), la resta dels valors obtinguts foren idèntics als de les poblacions andorranes (Sger2, 3 i 4) i als de l'occitana d'Orlú (departament de l'Arieja) (Sger6). Això podria fer pensar que la població d'Ulldeter enclou una gran diversitat i que deuria representar el nucli diversificador o refugi del tàxon (Gómez & Lund, 2004). D'altra banda, l'estudi dels

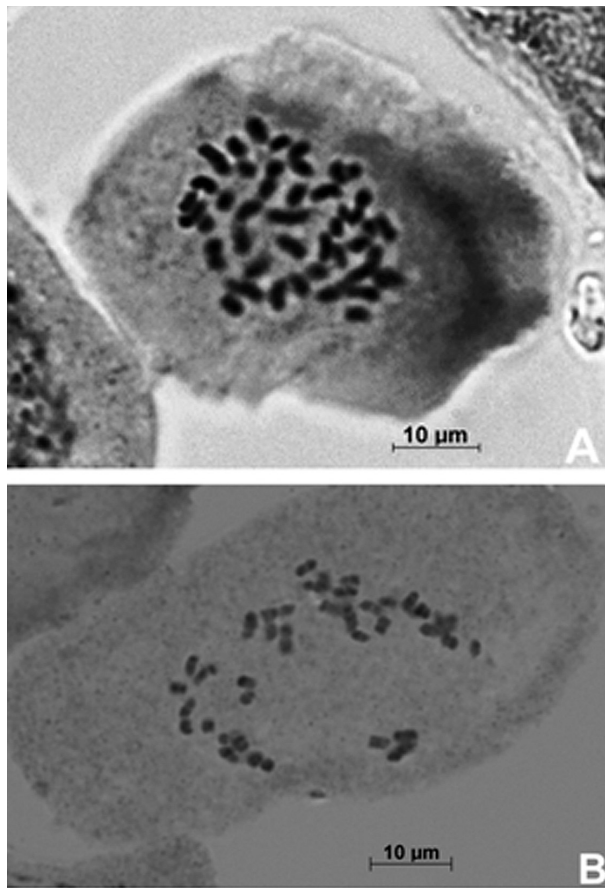


Figura 11. Metafases mitòtiques de *S. genesiana* Turó Gros (A) i *S. geranioides* Ulldeter (B).

haplotips, que aquí no mostrem, ens fa sospitar que la població del Puigmal (Sger7), podria ser la que va colonitzar el Montseny, atesos també la seva proximitat geogràfica i el seu similar contingut de DNA (vegeu figura 8 i Mas de Xaxars *et al.*, 2014).

De manera més general, les quantitats de DNA han estat útils per a confirmar la condició híbrida (Garcia *et al.*, 2008) de les poblacions de què ja sospitàvem aquest origen per mitjà de l'estudi morfològic. Ho hem comprovat per a *S. ×cadevallii* del Montseny (*S. genesiana* × *S. vayredana*), per a *S. ×jeanpertii* Luiz. (*S. moschata* × *S. pubescens* subsp. *pubescens*) de Núria (Sjea1) i per a *S. ×bubaniana* (*S. geranioides* × *S. pubescens* subsp. *pubescens*) d'Ulldeter (Sbub1). En tots aquests casos la quantitat de DNA dels individus híbrids correspon a aproximadament la mitjana entre la de les espècies parentals (Fig. 10), la qual cosa permet, a més, descartar esdeveniments d'introgressió o retroencreuament, ja que si se n'hagués donat trobaríem un ventall de quantitats de DNA en comptes de la mitjana.

A banda d'implicacions sistemàtiques teòriques, assenyalem que hem trobat una correlació positiva (coeficient de correlació d'Spearman = 0,496, $p=0,001$) entre el volum del gra de pol·len i la quantitat de DNA. Aquest fet ja havia estat reportat en nombrosos casos, bé que no sembla generalitzable per a totes les plantes (Knight *et al.*, 2010 i referències que conté). Darrerament, una de les autores d'aquest treball

ha detectat també aquest fenomen en tàxons del gènere *Echinops* L. (*Asteraceae*) (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2012).

Recomptes cromosòmics

Tant per a *S. genesiana* com per a *S. geranioides* hem comptat un nombre de cromosomes proper a $2n=44$ (Fig. 11). Tot i haver utilitzat en cada cas diversos individus i diverses plaques metafàsiques de cadascun, donem el nombre aproximat, perquè creiem que la difícil morfologia cromosòmica de *Saxifraga* en dificulta l'assignació exacta si hom no vol exposar-se a pecar d'imprudent. Per exemple Dalgaard (1991), atribueix $2n = 124$ cromosomes a *Saxifraga maderensis* L. i ben segur que el nombre exacte pot ser aquest, però la figura que aquest treball dona també podria fer-ne dir un altre de proper. Per a les plantes que ens ocupen ara, Vargas (1994) afirma que va intentar un recompte en meiosi de *S. geranioides* i en dona un resultat d' $n = 28$ que qualifica d'imprecís i que marca amb un interrogant, en la línia de prudència que abans esmentàvem. Aquest recompte donaria suport a un de previ de $2n = 52$ (vegeu Vargas, 1994). De *S. genesiana*, Vargas esmenta $2n = 44$ sense donar-ne precisions. Les quantitats de DNA nuclear dels dos tàxons ($2C = 1,75$ pg en *S. genesiana* i $2C = 1,70$ pg en *S. geranioides*; Mas de Xaxars *et al.*, 2014), pràcticament idèntiques, reforcen la nostra hipòtesi que el nombre cromosòmic sigui el mateix en totes dues espècies, ja que una diferència de vuit cromosomes, per petits que siguin, s'hauria de reflectir en una variació significativa d'aquest paràmetre.

Diferenciació entre *S. geranioides* i *S. genesiana*

Per llur morfologia general aquests dos tàxons són molt semblants entre ells, de manera que no és pas estrany que els botànics clàssics no els separessin ni a nivell subespecífic.

La descripció inicial de *S. genesiana* devia basar-se en gran part en l'exemplar obtingut per sembra fora del seu ambient natural, i per això no s'adiu gaire amb les característiques normals dels exemplars silvestres (a un dels quals correspon, però, el tipus nomenclatural). De totes maneres, el tàxon del Montseny se separa bé de *S. geranioides* per l'ornamentació de les granes (Fig. 6). En canvi, els caràcters foliars no són clarament discriminatòris, i els florals, en contra del que diu la descripció original (Vargas, 1997a) i la majoria de diagnòstics (per exemple Bolòs *et al.*, 2005, Sàez *et al.*, 2010), no tenen gens de consistència per a diferenciar aquests dos tàxons. Les fotografies i el dibuix de *S. genesiana* que figuren al *Llibre vermell* (Sàez *et al.*, 2010, p. 264 i 265) són ben representatius al respecte i avalen els comentaris precedents (tot i que hi manca informació sobre les granes).

A banda dels caràcters de les llavors, també són diferents les condicions ambientals en què es troba un i altre tàxon. Tots dos es fan en terreny silici i preferentment en llocs tarterosos ombrívols i de blocs poc mòbils. *Saxifraga geranioides* ocupa, als Pirineus, un interval d'altitud que va d'uns 1600 a 3000 m, però rarament abunda per davall de 2000 m. Sovint colonitza tarteres o caos de blocs i de vegades apareix dins els neretars dels vessants pedregosos. *Saxifraga genesiana*,

exclusiva del sistema Montseny-Guilleries, ateny els cims més elevats (1650 m) i s'estén de manera molt general fins a uns 1400 m, bé que pot descendir molt més (fins a 1200 m i àdhuc a 800 m). Es fa a les tarteres en vies de fixació, però també s'enfila pels esqueis del rocam o apareix dins els matollars de ginebró i a les clarianes de l'ayetosa.

Pel que fa al tractament taxonòmic de *S. genesiana*, diversos botànics posteriors a l'autor del nom han seguit el seu criteri i l'han considerada també com a espècie independent. En canvi Bolòs *et al.* (2005) la combinen com a subespècie de *S. geranioides*, malgrat que, com acabem de dir, li atribueixen caràcters foliars i florals equivocats. Cal tenir en compte que les categories taxonòmiques no han estat mai definides de manera inequívoca i excloent, i és difícil que ho siguin en un temps proper. A la pràctica, cada botànic, a partir de les dades (morfològiques, genètiques, biològiques, ecogeogràfiques...) concernents a cada població vegetal adopta el criteri taxonòmic que li sembla més adient. Se sol dir que la taxonomia és l'art de trobar diferències; la valoració i categorització d'aquestes diferències, sovint lligada a interpretacions genètiques i evolutives, ve després de l'anàlisi inicial i és una decisió personal rarament indiscutible.

Conclusions

L'anàlisi de la quantitat de DNA discrimina força bé els diferents tàxons estudiats, i mostra que dintre de *S. geranioides* es donen diferències interpoblacionals significatives. D'altra banda, el fet que la població d'Ulldeter enclogui una gran diversitat interna suggereix que en aquesta àrea podria trobar-se el nucli diversificador del tàxon.

La quantitat de DNA s'ha mostrat com a bon predictor d'hibridació, car en els híbrids estudiats correspon netament a la mitjana entre les de les espècies parentals. Ho hem comprovat en els casos de *S. genesiana* × *S. vayredana* (*S. × cadevallii*) del Montseny, *S. moschata* × *S. pubescens* subsp. *pubescens* (*S. × jeanpertii*) de Núria i *S. geranioides* × *S. pubescens* subsp. *pubescens* (*S. × bubaniana*) d'Ulldeter.

S. × cadevallii produeix pol·len viable, però no hi ha indicis de retroencruament entre aquest híbrid i les espècies parentals. D'altra banda, les seves llavors no semblen arribar mai a madurar, és a dir, que aquest híbrid és estèril.

Saxifraga genesiana i *S. geranioides* s. str., que són morfològicament molt properes i deuen ser-ho també genèticament, se separen entre elles sobretot per l'ornamentació de les llavors.

Agraïments

Aquest estudi s'ha beneficiat d'un ajut a la recerca, concedit per la Secció de Ciències Biològiques de l'Institut d'Estudis Catalans; i d'una beca predoctoral de docència i recerca de la Universitat de Barcelona atorgada a un dels autors (G. M. de X.). Hem d'agrair a l'especialista del gènere *Saxifraga* Pablo Vargas, del Real Jardín Botánico de Madrid, les informacions donades i els comentaris que sobre aquest tre-

ball ens ha fet. D'altra banda, també agraïm la col·laboració de diversos col·legues i estudiants que, en nombre de dinou, participaren en les recerques de camp i en les recollicions de material; no es deuran pas sentir menystinguts si no en repetim aquí llurs cognoms, que figuren en la columna tercera de la taula 1.

Bibliografia

- ALEXANDER, M. P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Biotechnic & Histochemistry*, 44 (3): 117-122.
- AVETISSIAN, E. M. 1950. Simplified method of pollen preparation by acetolysis. *Zhurnal Russkogo Botanicheskogo Obshchestva pri Akademii Nauk*, 35 (385): 6-7.
- BOLÒS, O. de & VIGO, J. 1984. *Flora dels Països Catalans*. Barcino, Barcelona. 2636 p.
- BOLÒS, O. de, VIGO, J., MASALLES, R. M. & NINOT, J. M. 2005. *Flora manual dels Països Catalans*. (3a edició). Pòrtic. Barcelona. 1310 p.
- DALGAARD, W. 1991. Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia, II. *Willdenowia*, 20: 139-152.
- DOLEŽEL, J., BINAROVÁ, P. & LUCRETTI, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31 (2): 113-120.
- FERNÁNDEZ ARECES, M. P., DÍAZ, T. E., LLAMAS, F., VALENCIA, R. M., FERNÁNDEZ, D., FOMBELLA, M. A. & PÉREZ CARRO, J. 1988. Morfología de las semillas de algunos taxones del género *Saxifraga* L. (Sect. *Dactyloides* Tausch.). *Lagascalia*, 15 (extra): 263-274.
- FONT, X. 2013. Mòdul Flora i Vegetació. Banc de Dades de Biodiversitat de Catalunya. Generalitat de Catalunya i Universitat de Barcelona. Disponible en: <http://biodiver.bio.ub.es/biocat/homepage.html> [Data de consulta: 5 juny 2012].
- GARCIA, S., CANELA, M. Á., GARNATJE, T., MCARTHUR, E. D., PELLICER, J., SANDERSON, S. C. & VALLÈS, J. 2008. Evolutionary and ecological implications of genome size in the North American endemic sagebrushes and allies (*Artemisia*, Asteraceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 94: 631-649.
- GARNATJE, T., VALLÈS, J., GARCIA, S., HIDALGO, O., SANZ, M., CANELA, M. Á. & SILJAK-YAKOVLEV, S. 2004. Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biology of the Cell*, 96 (2): 117-124.
- GOMEZ, A. & LUND, D. H. 2004. *Refugia within refugia: patterns of phylogeography concordance in the Iberian Peninsula*. P. 155-188. In: Weiss, S.; Ferrand, N. (eds.). *Phylogeography of southern European refugia*. Springer. Amsterdam. Netherlands. 377 p.
- KAPLAN, K. 1976. Zur embryologie und systematik der gattung *Saxifraga*. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 97: 61-71.
- KNIGHT, C. A., CLANCY, R. B., GÖTZENBERGER, L., DANN, L. & BEAULIEU, J. L. 2010. On the relationship between genome size and pollen size. *Journal of Botany*, vol. 2010, article ID 612017, 7 p.
- LUIZET, M. D. 1931. *Monographie des hybrides de Saxifrages Dactyles dits Dactyloides* P. 1-313 In: Guétrot, M. (ed.). *Plantes Hybrides de France Vol. 5-7*. Impr. Louis Jean. Gap. France. 313 p.
- MAS DE XAXARS, G., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., BARNOLA, P., MARTÍN, J., MERCADÉ, A., VALLÈS, J., VARGAS, P., VIGO, J. & GARNATJE, T. 2014. Phylogenetic and

- cytogenetic studies reveal hybrid speciation in *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* (Saxifragaceae). *Journal of Systematics and Evolution*. DOI: 10.1111/jse.12105
- OLIVER, X. & FONT, J. 2008. Catàleg de flora vascular de la Garrotxa. Institució Catalana d'Història Natural, Delegació de la Garrotxa. Olot. 165 p.
- REDONDO, N. & HORJALES, M. 1989. Datos cariológicos del género *Saxifraga* L. en el NW Ibérico. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 62 (sér. 2): 195-203.
- SÀEZ, L., AYMERICH, P. & BLANCHÉ, C. 2010. *Llibre vermell de les plantes vasculars endèmiques i amenaçades de Catalunya*. Argania. Barcelona. 811 p.
- SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, I., HIDALGO, O., CANELA, M. Á., SILJAK-YAKOVLEV, S., SOLIĆ, M. E., VALLÈS, J. & GARNATJE, T. 2012. Genome size and chromosome numbers of *Echinops* (Asteraceae, Cardueae) in the Aegean and Balkan regions: technical aspects of nuclear DNA amount assessment and genome evolution in a phylogenetic frame. *Plant Systematics and Evolution*, 298 (6): 1085-1099.
- VARGAS, P. 1994. Estudios biosistemáticos en el género *Saxifraga*: serie *Ceratophyllae* (s.l.). Tesis doctoral. Universidad Complutense. Madrid. Espanya.
- VARGAS, P. 1997a. Otra especie del género *Saxifraga* L. (*Saxifragaceae*) endémica del macizo del Montseny (Cataluña). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 55: 191-195.
- VARGAS, P. 1997b. *Saxifraga* L. P. 162-242. In: Castroviejo, S.; Lainz, M.; López González, C.; Montserrat, P.; Muñoz Garmendia, F.; Paiva, J.; Villar, L. (eds.). *Flora iberica*. Vol. 5. Real Jardín Botánico, C.S.I.C. Madrid. Espanya. 320 p.
- VARGAS, P. & NIETO-FELINER, G. 1995. Cytotaxonomical study of *Saxifraga* series *Ceratophyllae* s.l. (*Saxifragaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 197: 209-223.
- VILLEGAS & ALBA, N. 2002. Plantas vasculars del Quadrat UTM 31T DG46. Vidrà. *ORCA. Catàlegs Florístics Locals*, 14. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques. Barcelona. Espanya.
- WAKABAYASHI, M. & OHBA, H. 1988. *Cytotaxonomic study of the Himalayan Saxifraga*. P. 71-90. In: Ohba, H.; S. B. Malla, S.B. (eds.). *The Himalayan Plants*. Vol. 1. University of Tokyo Press. Tokyo. Japan. 386 p.

Confirmacions molecular i citogenètica de l'origen híbrid de *Jacobaea ×mirabilis* (*Asteraceae*, *Senecioneae*), amb notes nomenclaturals sobre aquest nom

Gemma Mas de Xaxars, Alain Fridlender, Teresa Garnatje, Joan Vallès

Phytotaxa, 234: 271-279 (2015)

Jacobaea ×mirabilis és un tàxon híbrid, anteriorment inclòs en el gènere *Senecio*, que s'origina amb *J. adonidifolia* i *J. leucophylla* com a progenitors. Habita en unes poques localitats franceses de muntanya, en els Pirineus i en el Massís Central. En aquest treball, caracteritzem l'híbrid i els tàxons parentals usant mètodes de filogènia molecular i citogenètics (mida del genoma). Aquestes dades són útils per tal de confirmar la condició híbrida del tàxon estudiat. A més, corregim un error en el tractament taxonòmic d'aquesta espècie dins de *Jacobaea*, proposem una nova combinació i efectuem la seva tipificació nomenclatural.

Molecular and cytogenetic confirmation of the hybrid origin of *Jacobaea* × *mirabilis* (Asteraceae, Senecioneae), with nomenclatural notes on this name

GEMMA MAS DE XAXARS¹, ALAIN FRIDLENDER², TERESA GARNATJE³ & JOAN VALLÈS¹

¹ Laboratori de Botànica - Unitat Associada CSIC, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Avinguda Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona (Catalonia, Spain); gmma85@hotmail.com, joanvalles@ub.edu

² Faculté des Sciences, Université de Provence - AMU, case 75, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille Cedex 3 (France); alain.fridlender@univ-amu.fr

³ Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB), Passeig del Migdia s/n, 08038 Barcelona (Catalonia, Spain); tgarnatje@ibb.csic.es

Abstract

Jacobaea × *mirabilis* is a hybrid taxon, formerly included in the genus *Senecio*, originating from *J. adonidifolia* and *J. leucophylla* as progenitors. It inhabits a few French mountain locations in the Pyrenees and in the Massif Central. In this paper, we characterize the hybrid and its parental taxa using molecular phylogenetic and cytogenetic (genome size) methods. These data are useful to confirm the hybrid status of the studied taxon. Additionally, we clarify nomenclatural issues connected with this species and fulfil the conditions for valid publication of its name in *Jacobaea*. The name of this hybrid is also lectotypified.

Key words: genome size, homoploid hybridization, nomenclatural combination, phylogeny, *Senecio* × *mirabilis*, typification

Introduction

Hybridization has classically been and is still recognized as a powerful evolutionary mechanism in plants, particularly in diversification and speciation through genetic exchange (Anderson 1949; Stebbins 1959; Arnold 2006). *Senecio* Linnaeus (1753: 866) (Asteraceae, Senecioneae) s.l. does not at all constitute an exception to this assertion, comprising many examples of hybrid formation (e.g. Lowe & Abbott 2004; James & Abbott 2005; Calvo *et al.* 2013). It has a cosmopolitan distribution and is one of the largest plant genera, with circa 1250 species, many of them in South America and southern Africa (Nordenstam 2007). Recently, 43 Euro-Mediterranean species were segregated from *Senecio* and placed in the genus *Jacobaea* Miller (1754: 667) (Greuter 2006) based upon molecular systematic studies (Pelser *et al.* 2006). Among these species, there are two Franco-Iberian endemic taxa, *J. adonidifolia* (Loiseleur) Méral (1812: 325) [≡ *Senecio adonidifolius* Loiseleur (1807: 566), *J. adonidifolia* (Loiseleur) Pelter & Veldkamp in Pelter *et al.* (2006: 2)] and *J. leucophylla* (Candolle) Pelter in Pelter *et al.* (2006: 7) [≡ *S. leucophyllus* Candolle (1813: 144)]. Again, the role of hybridization is not negligible in this rather small genus, also involving its type species, *J. vulgaris* Gaertner (1791: 445) [≡ *Senecio jacobaea* Linnaeus (1753: 870)] (Kirk *et al.* 2004; Winter *et al.* 2013).

A hybrid between *J. adonidifolia* and *J. leucophylla* was described in 1853 by Alfred Huet du Pavillon under the name “*Senecio leucophyllo-adonidifolius*” from Mount Canigó (also named Canigou, Pyrénées-Orientales, France, top at 2784 m). Huet du Pavillon (1853) recognized the unique specimen he found as perfectly intermediate in morphology between the parental taxa. Its name, however, was not validly published under Art. H.10.2 of the ICN (McNeill *et al.* 2012).

Based on an individual found in Jonquet’s herbarium, also collected in Mount Canigó but 29 years later, Jonquet & Loret in Loret (1880: 270) proposed another new name, also invalidly published, “*Senecio adonidifolio-leucophyllus*”. In 1882 a new hybrid specimen was found, referred to as “*Senecio leucophyllo* × *adonidifolius* Jonquet & Loret”, but in the northern part of Mount Canigó (LY s.n. in the Rouy herbarium, CAS-435501; Gautier 1891). Later, in his *Catalogue raisonné de la flore des Pyrénées-Orientales*, Gautier (1897) introduced for the first time the name *Senecio mirabilis* “Rouy in herb.” with indirect references to “*S. leucophyllo* × *adonidifolius*” in Huet du Pavillon (1853) and

Jonquet & Loret in Loret (1880). Finally, a third Pyrenean locality of this hybrid was found in 2000 at Er valley, circa 2300 m, 30 km SW from Canigó (Baudière 2001).

Outside the Pyrenees, this hybrid was first found by Abbé Coste in Mount Mézenc (France, Massif Central, Haute-Loire, top at 1753 m) in 1904/1905 (Chassagne 1957). The presence in this mountain massif of several new individuals appearing each year (Carles 1953) is doubtful: in the last 30 years botanists have followed the populations each year and always observed the same individuals exactly at the same localities (Fridlender, pers. obs.; Antonetti & Morel 2011).

The objectives of this work are: i) to confirm with genetic markers the hybrid origin of *Jacobaea* \times *mirabilis*, ii) to establish its genome size and DNA ploidy level, and iii) to summarize the historical knowledge concerning this taxon, to clarify its nomenclature and to typify its name.

Material and methods

Plant material

Collection of leaves for analyses was carried out in Mount Mézenc and in some surrounding Massif Central mountains (France), in August 2013. In August 2014 leaf material from the same (*J. \times mirabilis*, *J. leucophylla*) or other (*J. leucophylla*) individuals were collected for confirmation or complementary studies (Table 1, Appendix 1). Vouchers are deposited in the herbarium CLF, of the Institut des Herbiers Universitaires de Clermont-Ferrand (Appendix 1).

TABLE 1. Localities sampled and genome size assessments for the three *Jacobaea* taxa studied in southern Massif Central (France: Cantal, Haute-Loire and Ardèche). Mean HPCV=4.56. For the complete name and data on populations, see herbarium vouchers in Appendix 1.

Taxa / population	Number of individuals	2C DNA (pg)	SD
<i>J. adonidifolia</i>			
Borée	4	5.70	0.04
Les Estables	5	5.78	0.06
Lasoros	3	5.56	0.09
Tailhac	2	5.62	0.02
<i>J. leucophylla</i>			
Borée	13	5.76	0.04
Les Estables	15	5.91	0.05
<i>J. \timesmirabilis</i>			
Les Estables	1	5.94	0.01

DNA content assessment

Fresh young leaves of each collected plant (Table 1) were put in a 6 cm plastic Petri dish with leaves of *Petunia hybrida* 'PxPc6' (2C = 2.85 pg; Marie & Brown 1993) as internal standard in the proportions 2 : 1, and were covered with 1200 µl of LB01 buffer (Doležel *et al.* 1989) supplemented with 0.5% of Triton X-100 and 100 µg/ml ribonuclease A (RNase A, Boehringer, Meylan, France). Leaves were chopped with a razor blade and filtered through a 70-µm nylon filter in order to eliminate cell debris before the addition of 36 µl of propidium iodide (1 mg/ml, solution in water; Invitrogen Eugene, Oregon, USA) and kept on ice. The internal standard was first analyzed alone in 600 µl of LB01 buffer to locate its peak position. For each individual, two samples were extracted and analyzed independently, together with the standard. Fluorescence analysis was carried out using an Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, Florida, USA) at the Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona. Acquisition was stopped at 8,000 nuclei. The DNA content was calculated assuming a linear correlation between the fluorescence signals of the stained nuclei and DNA amount. Mean and standard deviations were calculated for 2C values of each population based on five studied individuals. The mean of the half-peak coefficient of variation (HPCV) was also calculated for both target plant and internal standard.

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA from one individual per taxon was extracted using the CTAB method (Doyle & Doyle 1987) as modified by Soltis *et al.* (1991) from silica gel-dried leaves collected in the field.

ITS region was amplified using ITS1 and ITS4 (White *et al.* 1990). The PCR profile began with 5 min at 80 °C followed by 29 cycles of 1 min denaturing at 94 °C, 45 s min annealing at 62 °C and 40 s extension at 72 °C, with a final extension step of 10 min at 72 °C. The plastid region *rpl32-trnL* was also amplified using the primers *rpl32-F* and *trnL^{UAG}* (Shaw *et al.* 2007) and the following PCR profile: 94 °C at 3 min; 34 cycles of 40 s at 95 °C, 40 s at 54 °C and 1 min 40 s at 72 °C, with a final step of 10 min at 72 °C. PCR were performed using a Thermocycler (MJ Research PTC 200, Basel, Switzerland). Final PCR products were checked on 1.2% agarose gels.

Direct sequencing of the amplified DNA segments were carried out using BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (PE Biosystems, Foster City, CA), following the protocol recommended by the manufacturer. ITS4 and *rpl32-F* were used as sequencing primers. Nucleotide sequencing was performed at the Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, on an ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (PE Biosystems, Foster City, CA).

Phylogenetic analyses

Jacobaea species closest to *J. adonidifolia* and *J. leucophylla* were selected from Escobar-García *et al.* (2012) and confirmed by BLAST searches (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), and ITS and *rpl32-trnL* sequences were downloaded from GenBank (see Appendix 2). Networks for ITS region was building using the program SplitsTree 4.12.6 (Huson & Bryant 2006) with the method uncorrected-P and handling the ambiguous states as average. TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000) was used to estimate relationships among haplotypes for the *rpl32-trnL* region.

Results and discussion

Jacobaea × mirabilis and its parental taxa's DNA content and ploidy level

This is the first nuclear DNA amount assessment for *J. × mirabilis*. For each of its parental taxa, *J. adonidifolia* and *J. leucophylla*, there is only one previous report (quoted as *S. adonidifolius* and *S. leucophyllus*, respectively; García *et al.* 2013). The 2C values here presented for the Massif Central plants (Table 1) are very close to the previously published one for *J. leucophylla* (5.91 pg), whereas they differ from that recorded for *J. adonidifolia* (4.9 pg), in both cases from Pyrenean populations. One chromosome number ($2n=40$) has been recorded for *J. leucophylla*, so that the agreement in genome size is logical. The variation found in *J. adonidifolia* could not easily be related to the presence of two cytotypes ($2n=20$ and $2n=40$, accounting for to two ploidy levels) recorded for this taxon: despite the frequent genome downsizing in polyploids, a bigger difference in nuclear DNA content between both ploidy levels would be expected, as happens in numerous Asteraceae taxa (Vallès *et al.* 2013). In any case, our genome size assessments show that the nuclear DNA amounts of *Jacobaea × mirabilis* and its parental taxa are very similar (Table 1, Figure 1). This allows us to postulate a homoploid origin for this hybrid, since it has the same ploidy level as its progenitors, *J. adonidifolia* and *J. leucophylla*. A case of homoploid hybrid [*Senecio squalidus* Linnaeus (1753: 869)] has also been detected in the closely related genus *Senecio* (James & Abbott 2005). Taking into account that we could not obtain viable achenes of *Jacobaea × mirabilis* and that we could not take any living plant for cultivation and root tip meristems obtention, due to its extreme scarcity, genome size estimation is useful to predict the chromosome number $2n=40$ for this hybrid taxon.

Nuclear and chloroplastic networks

ITS is a fragment of 666 bp, which provides clear evidence that *J. × mirabilis* is an F1 hybrid from *J. adonidifolia* and *J. leucophylla*. As showed in Table 2, we found 21 polymorphic sites in the parental taxa from positions 249 to 666. The hybrid sequence was intermediate for all these sites. The position of *J. × mirabilis* in the ITS network (Figure 2) also reflects these perfectly intermediate sequence features.

Haplotype network points to *J. leucophylla* as the plastid donor of our *J. × mirabilis* specimen (Figure 3). Interestingly, meanwhile ITS regions clearly define *Jacobaea* species and appear homogenized, the plastid network shows a pattern that can respond both to hybridization/introgression events or ancestral polymorphism. Indeed, many cases of hybridization both within *Jacobaea* (i.e. Cheng *et al.* 2011) and *Senecio* (i.e. Lowe & Abbott 2004) have been recorded, as well as potential intergeneric hybridization between *Senecio* and *Jacobaea* (Calvo *et al.* 2013).

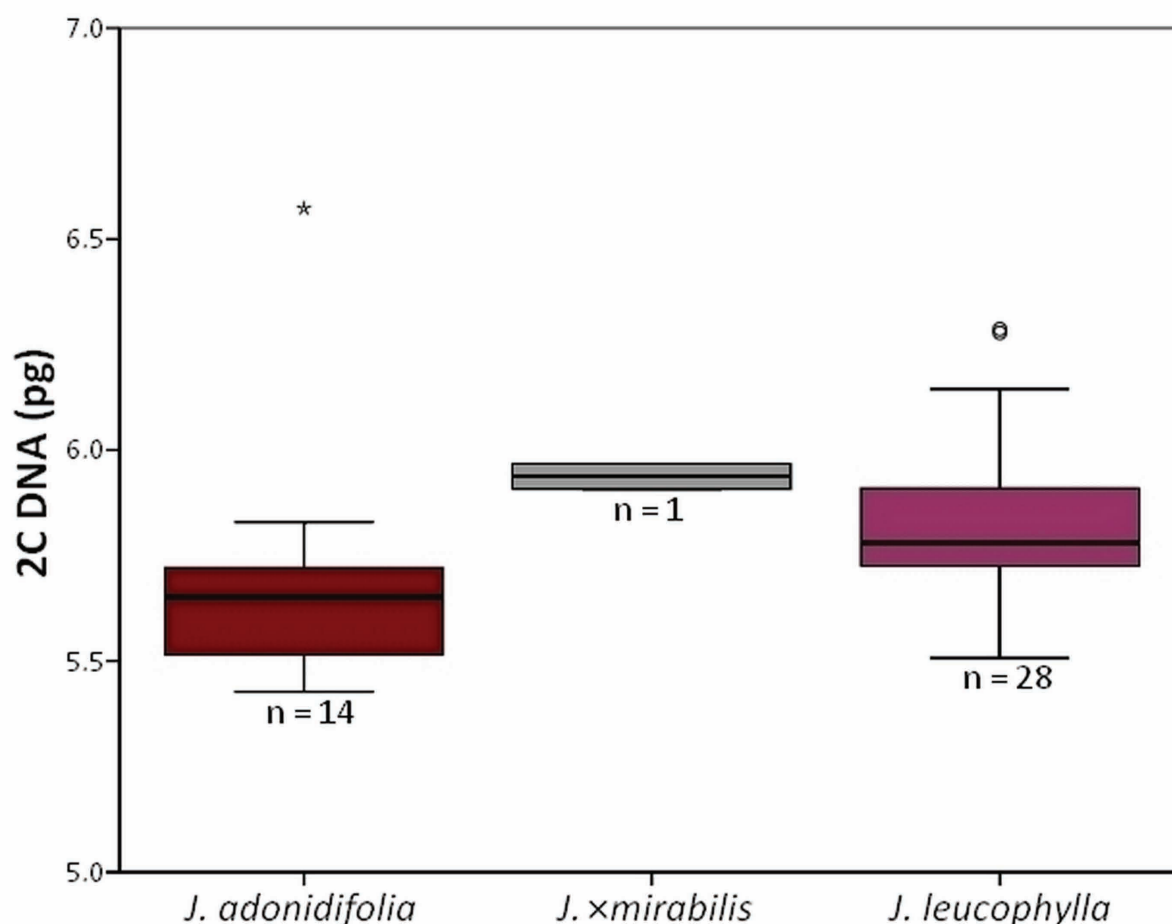


FIGURE 1. Boxplot graph indicating genome size means per species for the three *Jacobaea* taxa studied with standard deviation and the number of specimens sampled (n). Asterisk and circle indicate outlier values.

TABLE 2. Polymorphic positions in ITS fragment for the three *Jacobaea* taxa studied.

	253	256	260	287	349	378	424	430	450	467	520	532	541	560	562	572	604	612	618	621	634
<i>J. adonidifolia</i>	T	C	C	C	T	C	T	C	T	T	C	T	A	T	C	C	T	A	T	A	A
<i>J. x mirabilis</i>	W	M	Y	Y	Y	Y	Y	Y	K	K	Y	Y	W	Y	M	Y	K	W	K	R	M
<i>J. leucophylla</i>	A	A	T	T	C	T	C	T	G	G	T	C	T	C	A	T	G	T	G	G	C

Morphological and ecological considerations

Bonnet (1897) and Carles (1953) postulated that hybrid formation took place with pollen of *J. adonidifolia* fecundating *J. leucophylla* flowers. Once the hybrid is formed, it is easily recognizable since the leaves show an intermediate morphology between progenitors (Figure 2), although confusion in the field with not-so-hairy *J. leucophylla* individuals is possible (Fridlender, pers. obs.). Capitula of hybrid specimens are well developed and also show intermediate characters (basically in the indumentum) between those of parental taxa (Figure 4). Nevertheless, no fruits were available, as other authors noticed. Rouy (1903) stated “achaines... nuls dans mes exemplaires” and Baudière (2001) indicated that the plant was “apparemment stérile”. The absence of viable fruits also found in other hybrids (e.g. in *Saxifraga*; Mas de Xaxars *et al.* 2015) points to this situation of non-reproduction, at least by means of seed formation.

The rarity of the hybrid in the Pyrenees is also due to the fact that in most places its parental species only scarcely overlap. In eastern Pyrenees, Gautier (1897) located *J. adonidifolia* between 700 and 2100 m, *J. leucophylla* at 2650 m, and the hybrid at 2200 m. In Mézenc, where *J. adonidifolia* can be found growing right up to the summit of the mountain, the hybrid is still very scarce, but relatively more frequent, with three individuals (Antonetti & Morel 2011). Moreover, in the Pyrenees as well as in the Massif Central, both parental taxa have different ecological affinities; *J. leucophylla* rarely grows in non-pioneering communities, and *J. adonidifolia* is frequent in grasslands and shrublands (Fridlender, pers. obs.).

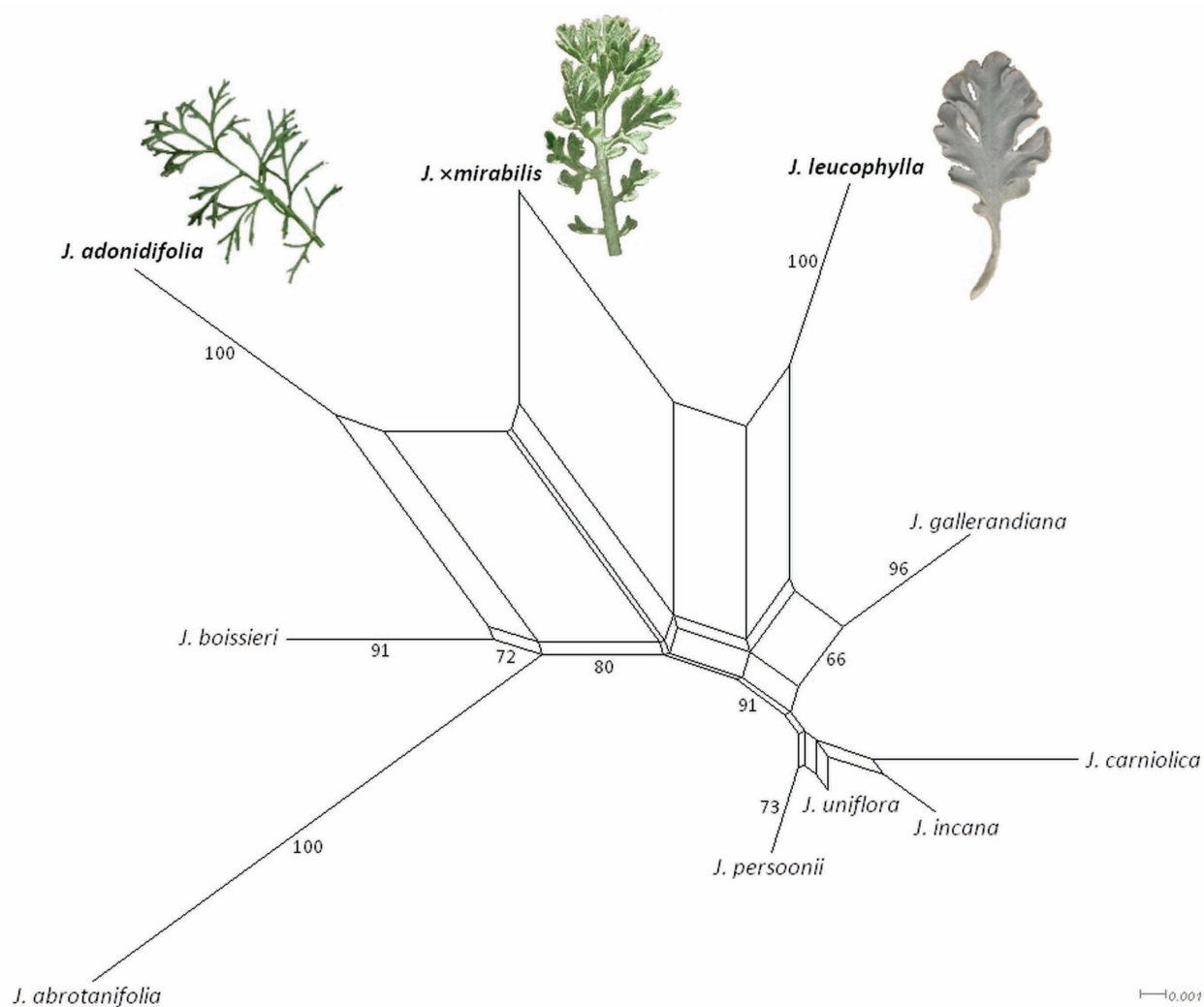


FIGURE 2. ITS network in *Jacobaea*, and leaves of the studied taxa. Numbers below the branches are bootstrap values.

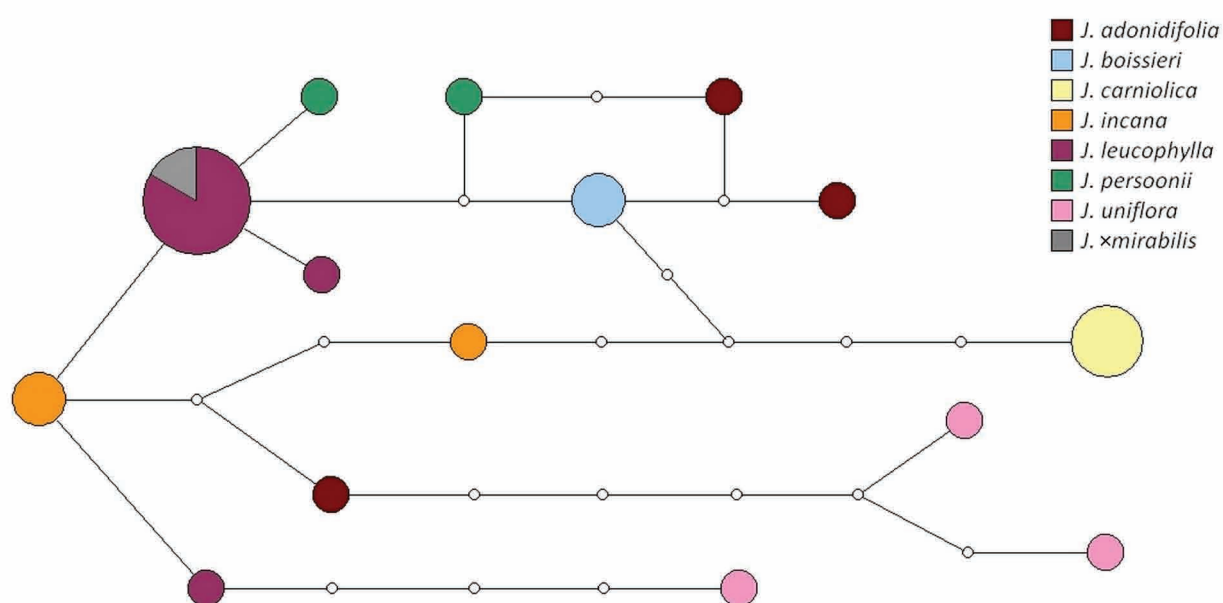


FIGURE 3. Haplotypes network from *rpl32-trnL* region in *Jacobaea*. Each circle corresponds to a haplotype and circles' size is proportional to haplotype frequency (from $n=1$ to $n=5$). Small white circles represent single mutational steps.

Nomenclatural notes and typification

The designations “*S. leucophyllo-adonidifolius*” Huet du Pavillon (1853: 253–254) and “*S. adonidifolio-leucophyllus*” Jonquet & Loret (1880: 270) were not validly published, since they use a formula as epithet, which is not accepted by the Code of nomenclature (Art. 23.6(d) and H.10; McNeill *et al.* 2012). The first validly published name for this hybrid is *S. mirabilis* Rouy ex Gautier. The name *Jacobaea* \times *mirabilis* “(Gautier ex Rouy)” Bock (2011: 265) was not validly published because Bock referred to Rouy (1903) as the place of valid publication of the basionym, whereas Rouy (1903) provided a direct reference to the actual place of valid publication (Art. 41.8(a)). The hybrid still requires a name when treated in *Jacobaea*. Consequently, we propose the following combination.

Jacobaea* \times *mirabilis (Rouy ex Gautier) Mas de Xaxars, Fridlender, Garnatje & Vallès-Xirau, **comb. nova**. Basionym:—*Senecio* \times *mirabilis* Rouy ex Gautier (1897: 227); Bock (2011: 265), **comb. inval.**

Lectotype (designated here):—FRANCE. Pyrénées-Orientales: Le Canigou le long du Canal Gros au dessus de las Counques (Pyren-or), altitude 2090 m, 12 July 1882, Gautier (LY – herb. Rouy!; islectotype: CAS-435501 – herb. Gautier!) (Figure 5A, B).

Syntype:—FRANCE. Pyrénées-Orientales: Plateau immédiatement après la rivière de Cady, en prenant la montée pour aller à Bassibès, tout à fait en commençant la montée, 20 August 1852, *Junquet* (MPU-028345!) (Figure 5C).



FIGURE 4. Capitula of the studied taxa (Mézens, August 2013). From left to right: *Jacobaea leucophylla*, *J. x mirabilis*, *J. adonidifolia* (two capitula of each taxon).



FIGURE 5. Lectotype (A), islectotype (B), and syntype (C) of *Jacobaea* \times *mirabilis*.

Concluding remarks

The hybrid status of *J. ×mirabilis* has been confirmed. Molecular and cytogenetic characterizations of the hybrid and its parental taxa in the Massif Central corroborate the morphological data and support the intermediary position of this taxon between its progenitors. Complementarily, nomenclatural aspects have been addressed. Further research on this hybrid and its relatives should comprise the study of the Pyrenean populations and, given its scarcity in terms of number of populations and individuals in both areas where it grows, intensive searches for new localities and, if necessary, conservation measures.

Acknowledgements

We gratefully thank M. Tort and curators of herbaria LY (G. Barrall), CLF (G. Thebaud), G (A. Charpin, N. Fumeaux), CAS (R. Petters, D. Trock), MPU (C. Loup, J. Mathez, J. Molina), for voucher and nomenclatural information, S.C. Brown and C. González for assistance in flow cytometric standards and determinations, and S. Pyke for English language revision. Two anonymous reviewers and the editor A. Sennikov are thanked for their comments, which improved the manuscript. Cytogenetic and molecular analyses have been subsidized by the Catalan government (2014SGR514) and the Spanish government (CGL2013-49097-C2-2-P). Gemma Mas de Xaxars received a predoctoral grant from Universitat de Barcelona.

References

- Anderson, E. (1949) *Introgressive hybridization*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 108 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.4553>
- Antonetti, P. & Morel, A. (2011) Un séneçon admirable... *À fleur de massif - Lettre d'information du Conservatoire botanique national du Massif Central* 4: 3.
- Arnold, M.L. (2006) *Evolution through genetic exchange*. Oxford University Press. New York, 252 pp.
- Baudière, A. (2001) Le Puigmal du périglaciaire et des endémiques. *Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest. Nouvelle Série* 42: 469–506.
- Bock, B. (2011) Révisions nomenclaturales et taxonomiques (note n° 1). *Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest. Nouvelle Série* 42: 263–278.
- Bonnet, M.E. (1897) Remarques sur quelques hybrides et sur quelques monstruosités. *Journal de Botanique* 15: 243.
- Calvo, J., Álvarez, I., Aedo, C. & Pelsner, P.B. (2013) A phylogenetic analysis and new delimitation of *Senecio* sect. *Crociseris* (Compositae: Senecioneae), with evidence of intergeneric hybridization. *Taxon* 62: 127–140.
- Candolle, A.P. de (1813) *Catalogus plantarum horti botanici monspeliensis*. J. Martel & A. Koenig, Paris & Strasbourg, 155 pp.
- Carles, R.P.J. (1953) A travers le Velay. *Bulletin de la Société Botanique de France* 100: 59–67.
<http://dx.doi.org/10.1080/00378941.1953.10833244>
- Chassagne, M. (1957) *Inventaire analytique de la flore d'Auvergne et des contrées limitrophes des départements voisins*, vol. 2. P. Lechevalier, Paris, 542 pp.
- Cheng, D., Kirk, H., Mulder, P.P., Vrieling, K. & Klinkhamer, P.G. (2011) Pyrrolizidine alkaloid variation in shoots and roots of segregating hybrids between *Jacobaea vulgaris* and *Jacobaea aquatica*. *New Phytologist* 192: 1010–1023.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03841.x>
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Doležel, J., Binarová, P. & Lucretti, S. (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum* 31: 113–120.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02907241>
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Escobar-García, P., Winkler, M., Flatscher, R., Sonnleitner, M., Krejčíková, J., Suda, J., Hülber, K., Schneeweiss, G.M. & Schoenswetter,

- P. (2012) Extensive range persistence in peripheral and interior refugia characterizes Pleistocene range dynamics in a widespread Alpine plant species (*Senecio carniolicus*, Asteraceae). *Molecular Ecology* 21: 1255–1270.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05456.x>
- Gaertner, J. (1791). *De fructibus et seminibus plantarum*, vol. 2. Typis Academiae Carolinae, Stuttgart, 167 pp.
- Garcia, S., Hidalgo, O., Jakovljević, I., Siljak-Yakovlev, S., Vigo, J., Garnatje, T. & Vallès, J. (2013) New data on genome size in 128 Asteraceae species and subspecies, with first assessments for 40 genera, three tribes and two subfamilies. *Plant Biosystems* 147: 1219–1227.
<http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2013.863811>
- Gautier, G. (1891) Quelques plantes rares ou nouvelles des Pyrénées-Orientales. *Bulletin de la Société Botanique de France* 38: XII–XX.
<http://dx.doi.org/10.1080/00378941.1891.10839593>
- Gautier, G. (1897) *Catalogue raisonné de la flore des Pyrénées-Orientales*. Publications de la Société Agricole, Scientifique et Littéraire des Pyrénées-Orientales, Perpignan, 550 pp.
- Greuter, W. (2006) Compositae (pro parte majore). In: Greuter, W. & Raab-Straube, E. von (Eds.) *Euro+Med Plantbase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity*. Available from: <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed> (accessed 31 July 2015).
- Huet du Pavillon, A. (1853) Description de quelques plantes nouvelles des Pyrénées. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, sér. 3* 19: 251–256.
- Huson, D.H. & Bryant, D. (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- James, J.K. & Abbott, R.J. (2005) Recent, allopatric, homoploid hybrid speciation: the origin of *Senecio squalidus* (Asteraceae) in the British Isles from a hybrid zone on Mount Etna, Sicily. *Evolution* 59: 2533–2547.
<http://dx.doi.org/10.1554/05-306.1>
- Kirk, H., Máčel, M., Klinkhamer, P.G.L. & Vrieling, K. (2004) Natural hybridization between *Senecio jacobaea* and *Senecio aquaticus*: molecular and chemical evidence. *Molecular Ecology* 13: 2267–2274.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02235.x>
- Linnaeus, C. (1753) *Species Plantarum*. Impensis Laurentii Salvii, Stockholm, 1200 pp.
- Loiseleur, J.L.A. (1807) *Flora Gallica, seu enumeratio plantarum in Gallia sponte nascentium*, vol. 2. Ex typis Matthaei Migneret, Paris, 742 pp.
- Loret, M.H. (1880) Causeries botaniques. *Bulletin de la Société Botanique de France* 27: 265–275.
<http://dx.doi.org/10.1080/00378941.1880.10825899>
- Lowe, A.J. & Abbott, R.J. (2004) Reproductive isolation of a new hybrid species, *Senecio eboracensis* (Asteraceae). *Heredity* 92: 386–395.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800432>
- Mas de Xaxars, G., García-Fernández, A., Barnola, P., Martín, J., Mercadé, A., Vallès, J., Vargas, P., Vigo, J. & Garnatje, T. (2015) Phylogenetic and cytogenetic studies reveal hybrid speciation in *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* (Saxifragaceae). *Journal of Systematics and Evolution* 53: 53–65.
<http://dx.doi.org/10.1111/jse.12105>
- Marie, M. & Brown, S.C. (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* 78: 41–51.
[http://dx.doi.org/10.1016/0248-4900\(93\)90113-S](http://dx.doi.org/10.1016/0248-4900(93)90113-S)
- McNeill, J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme van Reine, W.F., Smith, G.F. & Wiersema, J.H. (2012) *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*. [Regnum Vegetabile 154] Königstein, Koeltz Scientific Books, 208 pp.
- Mérat, F.V. (1812) *Nouvelle Flore des environs de Paris*. Méquignon-Marvis, Paris, 420 pp.
- Miller, P. (1754) *Abridgement of the gardeners' dictionary*, ed. 4. Printed for the author, London, unpaginated.
- Nordenstam, B. (2007) Tribe Senecioneae Cass. In: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (Eds.) *Asterales. Kubitzki's The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 8. Springer, Berlin, pp. 208–241.
- Pelser, P.B., Veldkamp, J.F. & van der Meijden, R. (2006) New combinations in *Jacobaea* Mill. (Asteraceae – Senecionae). *Compositae Newsletter* 44: 1–11.
- Rouy, G. (1903) Composées. In: Rouy, G. & Foucaud, J. (Eds.) *Flore de France*, vol. 8. Chez G. Rouy, Asnières; Les Fils d'Émile Deyrolle, Paris, France, pp. 130–375.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. & Small, R.L. (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275–288.

<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.94.3.275>

- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Collier, T.G. & Edgerton, M.L. (1991) Chloroplast DNA variation within and among genera of the *Heuchera* group (Saxifragaceae): Evidence for chloroplast transfer and paraphyly. *American Journal of Botany* 78: 1091–1112.
<http://dx.doi.org/10.2307/2444898>
- Stebbins, G.L. (1959) The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society* 103: 231–251.
- Vallès, J., Canela, M.Á., García, S., Hidalgo, O., Pellicer, J., Sánchez-Jiménez, I., Siljak-Yakovlev, S., Viales, D. & Garnatje, T. (2013) Genome size variation and evolution in the family Asteraceae. *Caryologia* 66: 221–235.
<http://dx.doi.org/10.1080/00087114.2013.829690>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. & White, T. (Eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 315–322.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Winter, S., Chizzola, R., Kriechbaum, M. & Kropf, M. (2013) Hybridisation in *Jacobaea* – characterisation of hybrids between *Jacobaea aquatica* and *J. vulgaris* in Austria. *Plant Ecology and Diversity* 6: 217–229.
<http://dx.doi.org/10.1080/17550874.2013.771475>

APPENDIX 1

Specimens examined

Jacobaea ×mirabilis: FRANCE. Haute-Loire: Les Estables, Massif du Mézenc, shrubland being colonised by pines, circa 1700 m, *A. Fridlender*, sub *Senecio ×mirabilis* (July 2001, CLF-104675!; 13 August 2013, CLF-104676!; 1 August 2014, CLF-104677!).

Jacobaea leucophylla: FRANCE. Ardèche: Borée, Massif du Mézenc, screes with big stabilised blocks, colonised by big individuals *Jacobaea*, 1680–1730 m, *A. Fridlender* (August 1991, CLF-104678!; 13 August 2013, CLF-104679!; 1 August 2014, CLF-104680!); FRANCE. Haute-Loire: Les Estables, Massif du Mézenc, phonolithes in cryoturbated zones, almost pure *Jacobaea* population, 1690–1730 m, *A. Fridlender*, sub *Senecio leucophyllus* (August 1991, CLF-104681!; 13 August 2013, CLF-104682!; 1 August 2014, CLF-104683!).

Jacobaea adonidifolia: FRANCE. Ardèche: Borée, Massif du Mézenc, shrubland, 1550–1680 m, *A. Fridlender* (13 August 2013; CLF-104684!). Haute-Loire: Tailhac, le Bois du Travers, beech and chestnut forest edge, 830 m, *A. Fridlender* (7 August 2013, CLF-104685!). Haute-Loire, Les Estables, Massif du Mézenc, 1400 m, *A. Fridlender* (13 August 2013, CLF 104686!). Cantal: La Chaze-de-Peyre à Lasoros, grass lawn with brooms at the edges of pine and birch forests, 1085 m, *A. Fridlender* (6 August 2013, CLF-104687!).

APPENDIX 2

GenBank accession numbers of the nucleotide sequences used in this study.

ITS: ***J. abrotanifolia*** AF459956, HE585514, HE585515, HE585516; ***J. adonidifolia*** AF459955, HE585517, KT944314; ***J. boissieri*** AY155603, HE585518, HE585519; ***J. carniolica*** AF459942, AY155604, HE586331; ***J. gallerandiana*** AY327531; ***J. incana*** AY155609, HE585508, HE585522, HE585523, KT944315; ***J. leucophylla*** AY155611, HE585524, HE585525, KT944316; ***J. persoonii*** AY155613, HE585526; ***J. uniflora*** AY155608, HE585520, HE585521; ***J. ×mirabilis*** KT944317.

rpl32-trnL: ***J. abrotanifolia*** HE614368, HE614369; ***J. adonidifolia*** HE614370, HE614371, KT944311; ***J. boissieri*** HE614372, HE614373; ***J. carniolica*** FR797140, FR797178, FR797229; ***J. incana*** HE614389, HE614392, HE614395; ***J. leucophylla*** HE614423, HE614424, HE614437, HE614438, HE614439, KT944312; ***J. persoonii*** HE614425, HE614426; ***J. uniflora*** HE614374, HE614375, HE614376; ***J. ×mirabilis*** KT944313.

Els resultats de la hibridació en les espècies alpines de *Rhaponticum* (*Asteraceae*, *Cardueae*)

Gemma Mas de Xaxars, Joan Vallès, Teresa Garnatje

Pendent d'enviar al Botanical Journal of the Linnean Society

El grup alpi del gènere *Rhaponticum* està format per dues espècies, *R. heleniifolium* i *R. scariosum*, les quals són rares. Les seves relacions filogenètiques no estan clares i en un estudi previ es van trobar algunes evidències d'hibridació. Per tal de veure si la hibridació podria ser una amenaça per a aquests tàxons, hem dissenyat un mostreig poblacional centrant-nos en la zona oest dels Alps –on coexisteixen. Els espècimens s'han caracteritzat morfològicament pel capítol i genèticament usant la regió ITS com a codi de barres. Els aquenis es van caracteritzar per la forma i es van posar a germinar per tal d'obtenir la seqüència ITS de tots els que van arribar a l'estadi de plàntula. Hem obtingut una estimació de la freqüència d'hibridació entre aquests tàxons alpins i es discuteixen les implicacions que pot tenir en la seva conservació. Hem realitzat també xarxes amb les regions nuclears ITS i ETS, així com una datació amb les regions cloroplàstiques seqüenciades, per tal d'establir les relacions entre les espècies alpines de *Rhaponticum* i les seves espècies properes, i analitzar si han tingut lloc processos d'hibridació introgressiva o d'especiació híbrida homoploide en les espècies estudiades. Finalment, es debat el tempo de la colonització dels Alps així com el rol de la crisi salina del messinià en la diversificació del gènere.

The outcomes of hybridisation in alpine *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae)

GEMMA MAS DE XAXARS^{1*}, JOAN VALLÈS¹ and TERESA GARNATJE²

¹*Laboratori de Botànica – Unitat associada CSIC, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n 08028, Barcelona, Catalonia, Spain*

²*Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB), Passeig del Migdia s/n, Parc de Montjuïc 08038, Barcelona, Catalonia, Spain*

*Corresponding author. E-mail: gmasdexaxars@ub.edu

Running title: Hybridisation in alpine *Rhaponticum*

Abstract

The *Rhaponticum* Alpine group is composed of two species, *R. heleniifolium* and *R. scariosum*, which are considered rare. Their phylogenetic relationships remain unclear, and evidence of hybridisation was found in a previous study. In order to determine whether hybridisation is a threat for these taxa we performed a populational sampling focusing, on the western Alps, where the two taxa coexist. Specimens were characterised morphologically by capitulum traits and genetically using ITS as barcode. Achenes were morphologically characterised and put into germination in order to obtain the ITS sequence of all that would reach the seedling stage. We obtained an estimation of the hybridisation frequency in these alpine taxa, and its implications in their conservation are discussed. Nuclear (ITS and ETS) networks and chloroplast dating were also performed to establish the relationships of alpine *Rhaponticum* and their allies, and analyse whether introgressive hybridisation or homoploid hybrid speciation processes occurred in the studied species. Finally, the Alps colonisation timing is debated as well as the role of the Messinian salinity crisis in the genus diversification.

Additional keywords: Alps – conservation – introgressive hybridisation – homoploid hybrid speciation – Messinian salinity crisis – spontaneous hybridisation - sympatry.

Introduction

The role of hybridisation has been one of the most controversial topics in the field of evolutionary studies in plants (Stebbins, 1950; Soltis & Soltis, 2009). Natural hybridisation and introgression may lead to many possible outcomes (Arnold, 1997), the most outstanding of which are: i) the reinforcement of reproductive barriers, ii) the merging of the hybridising forms, iii) the production of introgressed genotypes, and iv) the formation of hybrid species (Arnold, 1992; Abbott *et al.*, 2013). In any case, the most noticed result is a sterile, or mostly sterile, hybrid F₁ generation without significant effect on the fitness of the parental taxa (Arnold, 1997; Mas de Xaxars *et al.*, 2015). The outcome of hybridisation depends on genetic (e.g. chromosomal rearrangements; Rieseberg, 2001), ecological and spatial factors (Stebbins, 1959; Marques *et al.*, 2010; Abbott *et al.*, 2013) being therefore quite unpredictable.

Because of the complexity of hybridisation in plants, several studies have focused on processes and mechanisms involved in this phenomenon (Anderson & Stebbins, 1954; Arnold, 1997; Golding & Strobeck, 1983; McDade 1990; Hegarty *et al.*, 2008), often relating them to speciation events (Stebbins, 1950; Grant, 1981; Rieseberg & Willis, 2007). In the present article, we will focus on the detection of hybrid taxa in protected areas, bearing in mind that the hybridisation can influence the decisions regarding “what” and “how” we have to preserve (Cozzolino *et al.*, 2006; López-Pujol *et al.*, 2012).

Rhaponticum Vaill. (Greuter *et al.*, 2005), a genus belonging to the Asteraceae family, Cardueae tribe, comprises ca. 25 perennial herbs distributed on the one side in the occidental Mediterranean region and Canary Islands, and on the other, in the Caucasus, Siberia, Central and Eastern Asia, and Eastern Australia. In this study we focus on the two *Rhaponticum* species endemic to the Alps: *R. scariosum* Lam. and *R. heleniifolium* Gren. & Godr. *Rhaponticum scariosum* grows on siliceous substrates in the south-west and central Alps (Dostál, 1976). Two allopatric subspecies are

recognised for *R. heleniifolium*, both growing on calcareous substrate: subsp. *heleniifolium* in the High Alps (France), and subsp. *bicknelli* (Briq.) Greuter in the Maritime Alps (France-Italy) (Greuter, 2003). Two subspecies have also been described in *R. scariosum* showing a preference for siliceous soils (*R. scariosum* subsp. *scariosum* is the unique subspecies growing in French Alps and subsp. *rhaponticum* (L.) Greuter grows in Slovenian Alps). No clear morphological differences have been found between the diagnoses of both taxa. A previous phylogenetic study including *Rhaponticum* and some related genera (Hidalgo *et al.*, 2006) placed both species in well-supported subclades within the occidental clade (which contains all occidental Mediterranean *Rhaponticum* taxa). However, incongruent phylogenetic signals between nuclear and chloroplast regions used in this phylogenetic reconstruction and some weakly supported nodes inside the occidental clade, point to the need of further studies in order to get a better understanding of the evolutionary history of this clade (Hidalgo *et al.*, 2006).

Hidalgo (2006) found some cytogenetic evidence of hybridisation involving the above-mentioned species. Although these taxa are only included in some red lists (Liste Rouge de la Flore Vasculaire de France Métropolitaine, 2012), in this work we propose to study whether or not hybridisation can have effects on the fitness and, subsequently, on the conservation status of populations.

Because *R. heleniifolium* subsp. *bicknellii* is considered extinct in the French Alps (Hidalgo, pers. comm.) and the distribution of *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* is merged into the distribution area of *R. scariosum*, we have focused our study on the sampling and analyses of *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* in the French Alps in order to determine whether or not hybridisation is occurring, and to evaluate the persistence of pure populations.

The main objectives of this study were: i) to characterise the past and current hybridisation events, ii) to estimate the frequency of current hybridisation and, iii) to clarify the relationships between alpine *Rhaponticum* and to situate the diversification

processes in a temporal framework in an attempt to date Alps colonisation by these plant taxa.

Materials and methods

Plant material

Collections of leaves and capitula from *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* and *R. scariosum* were carried out in the Hautes Alpes (France) in order to detect individual hybrids (analysing the seedlings) of known mothers (analysing the leaves). Two collections were carried out in different seasonal periods due to the floral asynchrony shown by these species. All Alps locations are given in Table 1 and Figure 1. Leaves were preserved in silica gel, capitula and achenes were stored at 16°C. We carried out an intensive sampling in the only locality where both taxa coexist. Available material of *R. heleniifolium* subsp. *bicknellii*, *R. longifolium* (Hoffmanns. & Link) Soskov subsp. *longifolium*, *R. centauroides* (L.) O.Bolòs and *R. serratuloides* (Georgi) Bobrov from previous collections was also analysed. In addition, we included in this study material of *R. scariosum* from three localities in the central Alps from the Botanische Staatssammlung München (M) (see Table 1 for more details). Herbarium vouchers of the studied taxa have been deposited in the Herbarium of the Institut Botànic de Barcelona (BC).

Germination tests

A total of 1570 achenes were scanned (925 of which individually weighed) and put into germination in plates ordered according to the mother plant (the above-quoted 925, numbered) with watered filter paper, and stored in darkness and constant temperature of 17°C. The filter paper was changed every 10-12 days for the first three months of the assay until the germination rates declines.

Germinated achenes were placed in small pots with soil in a growth chamber in constant conditions of 20 °C and 12 h photoperiod. Cotyledons were silica-gel dried when the first leaf was well developed.

Length and weight measures as well as image scanning of the 925 achenes were carried out in an attempt to characterise hybrids from achenes as a conservational tool.

Correlation tests were carried out using SPSS package 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) in order to analyse differences in length and height as well as between germinated and non-germinated achenes.

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA from 81 individuals collected in the field (see Table 1) was extracted from silica gel-dried leaves using the CTAB method (Doyle & Doyle, 1987) as modified by Soltis *et al.* (1991). The same procedure was used for DNA extractions from 179 cotyledons of seedlings and herbarium specimens (Table S1).

Amplification of ITS regions by PCR was performed using primers ITS1 and ITS4 developed by White *et al.* (1990). The PCR profile began with 5 min at 80 °C followed by 29 cycles of 1 min denaturing at 94 °C, 45 s min annealing at 62 °C and 40 s extension at 72 °C, with a final extension step of 10 min at 72 °C. The ETS region was amplified with ETS1f and 18S-2L primers (Linder *et al.*, 2000). PCR procedure includes 95°C for 5 min and 30 cycles as flows: 94°C for 45 s, 50 °C for 45 s and 72 °C for 40s, and a final extension of 72°C for 7 min.

Furthermore, three plastid regions were also amplified: *trnL-trnF*, primers *trnL-c* and *trnL-f* (Taberlet *et al.*, 1991), *rpl32-trnL*, primers *rpl32-F* and *trnL^{UAG}* (Shaw *et al.*, 2007) and *3'trnV-ndhC*, primers *trnV^{UAC}x2* and *ndhC* (Shaw *et al.*, 2007). The PCR protocols for these regions were carried out as follow: *trnL-trnF*: 95°C at 3 min; 34 cycles of 1 min for denaturing at 93°C, 1 min for annealing at 54°C and 1 min extension at 72°C, with a final step of 10 min at 72°C. *rpl32-trnL*: 94°C at 3 min; 34 cycles of 40 s

at 95°C, 40 s at 54°C and 1 min 40 s at 72°C, with a final step of 10 min at 72°C. 3'*trnV-ndhC*: 80°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, primer annealing at 50°C for 1 min, followed by a ramp of 0.3°C/s to 65°C, and primer extension at 65°C for 4 min, followed by a final extension step of 5 min at 65°C. PCR were performed using a Thermocycler (MJ Research PTC 200, Basel, Switzerland). Final PCR products were checked on 1.2% agarose gels.

Direct sequencing of the amplified DNA segments was performed using BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (PE Biosystems, Foster City, CA), following the protocol recommended by the manufacturer. ITS4, 18S-2L, *trnLc*, *rpl32-F* and *ndhC* were used as primers for amplification of the respective regions (in some cases both amplification primers were used for sequencing). Nucleotide sequencing was carried out at the Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona on an ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (PE Biosystems, Foster City, CA).

Phylogenetic analyses

For the phylogenetic analyses, 336 sequences of ITS region (320 new), 42 of ETS (28 new), 18 sequences (8 new) of *trnL-trnF* region and 18 (11 new) of *rpl32-trnL* region were used (see Table S1). DNA sequences were edited using Chromas 1.56 (Technelysium Pty, Tewantin, Australia) and visually aligned by sequential pair-wise comparison with BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999). ITS region was chosen as a barcode region for seedlings taxa characterisation on the basis of previous works (Hidalgo, 2006) and its ease of amplification.

Networks for ITS and ETS regions were built separately using the program SplitsTree 4.12.6 (Huson & Bryant, 2006) with the method uncorrected-P and handling the ambiguous states as average. ILD test was implemented with PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2003) to assess incongruence between these two nuclear regions.

Data set of concatenated chloroplast regions (*rpl32-trnL*, *trnL-trnF*) was analysed using jModeltest (Darriba *et al.*, 2012) to determine the sequence evolution

model that best described the data according to the AIC criterion. The model GTR+G was used to perform a Bayesian analysis using the program Mr. Bayes 3.2.1 (Huelsenbeck *et al.*, 2001). Indels were coded as binary characters following the simple indel coding method (Simmons & Ochoterena, 2000) and analysed in a different partition using the model K80. Four Markov chains were run simultaneously for 1000000 generations, and these were sampled every 1000 generations. Data from the first 2000 generations were discarded as the burn-in period, after confirming that likelihood values had stabilised prior to the 1000th generation. The 50% majority rule consensus phylogeny and posterior probability (PP) of nodes were calculated from the remaining sample. *Cheirolophus mauritanicus* (Font Quer) Susanna, *C. teydis* (C.Sm.) G.López and *Rhaponticoides hajastana* (Tzvelev) M.V.Agab. & Greuter were used as outgroup, based on Vitales *et al.* (2014).

Estimating the timing of speciation processes

We followed the same procedure described in Vitales *et al.* (2014) to estimate *Cheirolophus* divergence time (a genus very close to *Rhaponticum*). A Bayesian-relaxed clock model was implemented in BEAST 1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007) for the same chloroplast data set previously analysed with MrBayes (but in this case without gap partition). The GTR+G substitution model was used again and the Yule model was selected as the tree prior. As clock prior we used the uncorrelated lognormal rate variation among branches, with a broad uniform distribution ($10^{-1} - 10^{-6}$) and for the standard deviations parameter a default exponential prior. We selected a normal prior distribution for the node age parameter, with a median of 24.51 Ma and a standard deviation of 2.7 Ma to span the confidence interval of 95% high probability density (HPD): 20.17-29.62 Ma. This calibrating point was chosen by Vitales *et al.* (2014) following the complete dating analysis of the tribe Cardueae of Barres *et al.* (2013), based on five fossil calibration points. The Markov chain was run for 1×10^7 generations, sampling every 1000th generation. To check the convergence and mixing

of each parameter (i.e. ESS values >200), Tracer 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) was used. Trees were summarised in TreeAnnotator 1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007) in a maximum clade credibility (MCC) tree and visualised in FigTree 1.3.1 (Rambaut & Drummond, 2009).

Results and discussion

Current hybridisation

No differences have been found along plastid sequences from 75 individuals among the taxa analysed (data not shown). From 1570 sown achenes, only 179 achieved the seedling stage. The percentage of achenes that reached the seedling stage is strongly variable among different capitula (from 0 to 80%) but this represents an average survival rate of 11.46%. Only two of these 180 individuals (1.12%) are hybrids between *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* and *R. scariosum* (one from Moline en Champsaur 'A' and the other from Col de Gleize 'C', Table 1) and both showed plastid sequences like *R. scariosum*. For one of them [C4(9)], we were able to characterise the mother plant (individual C-4, Table 1) as well as two non-hybrid seedlings from this mother plant, which exhibit (these two non-hybrid plants and the mother one) *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* ribotype and haplotype (Figs. 2, 3 and S1). Thus, we detected a case of paternal chloroplast model of inheritance in this hybrid (Fig. S1). This requires further studies because, having a unique haplotype per taxon, we cannot know whether paternal inheritance is widespread in *Rhaponticum*, since it is known that mother-inherited plastid species may present a small percentage of paternal inheritance [e.g. 1.86% in *Helianthus verticillatus* E.Watson (Asteraceae), Ellis *et al.* (2008); a high percentage as compared with the 0.002% found in *Nicotiana sylvestris* Speg. & S.Comes (Solanaceae), Thyssen *et al.* (2012)].

The results of the germination analyses show that germinated achenes presented a better correlation ($R^2=0,444$) between length and weight than non-

germinated ones ($R^2=0,214$). The lower weight in non-germinated achenes could be explained by their hybrid condition, but we cannot exclude the implication of other factors, such as the presence of hymenoptera larvae at different stages inside the capitula, devouring seeds and removing its content as revealed in a study carried out by Vitales et al. (2013) on Portuguese populations of *Cheirolophus uliginosus* (Brot.) Dostál.

No differences were observed in the colour of achenes in hybrids, so we can conclude that colour is not a character that can be used as discriminant in hybridisation detection in the alpine *Rhaponticum*. From adult specimens collected, only one was hybrid (Moline en Champsaur 'A', Table 1), which showed chloroplast sequences like *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* and intermediate capitula morphology, and no achene germinated from it.

Although the percentage of hybrids in this study is very small, as mentioned before, it allows us to state that some hybridisation episodes are occurring currently in the French Alps and that this hybridisation process takes place in both senses. Furthermore, the extremely low germination rate may also reinforce this hypothesis.

Unravelling Alps taxa relationships and past hybridisation

The network built with all ITS sequences (Table S1, Fig. S2) did not show any clear pattern and is polarised by the overrepresentation of *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* and *R. scariosum*.

ITS (Fig. 2) and ETS (Fig. 3) networks including sequences of the same individuals were performed with the aim of visualising the relationships within the Alpine *Rhaponticum* and also with the remaining taxa belonging to the occidental clade. Because of the incongruences displayed (ILD test, P value = 0.0004), these two regions have not been concatenated, but both networks showed a similar structure: *R. heleniifolium* subspecies are closer to *R. centauroides* from the Pyrenees, *R. scariosum* appear in three groups [1 and 2, constituted by individuals from the western

Alps (French Alps); and 3, constituted by individuals from the central and eastern Alps; Figs. 2 and 3)], and hybrids (*R. scariosum* × *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium*) are placed between their parental taxa but very close to *R. scariosum* from the French Alps (group 1, mixed population of Moline en Champsaur). The main difference between both networks is the position of *R. longifolium* subsp. *longifolium*, which is nested in group 3 of *R. scariosum* in the ETS network (Fig. 3).

Rhaponticum scariosum grouping in ITS and ETS networks (1, 2 and 3; Figs. 2 and 3) could be explained as non-homogenised groups of rDNA loci after hybridisation/introgression processes. The time that concerted evolution triggers to homogenise tandem repeats after an event of hybridisation is open to discussion and has been especially studied in allopolyploid species of recent formation [e.g. *Tragopogon mirus* Ownbey and *T. miscellus* Ownbey (Kovařík *et al.*, 2005) or the triploid *Cardamine* × *schulzii* Urbanska-Worytkevicz (Zozomová-Lihová *et al.*, 2014)]. Little is known about the mechanisms occurring after homoploid hybridisation. However, it is known that the occurrence of several rDNA loci located in separate chromosomes retards homogenisation (Nieto-Feliner & Rosselló, 2007).

In addition to current hybridisation, discussed in the previous section, it is clear that some hybridisation processes also took place in the past. Individuals of *R. scariosum* from the French Alps showing a very close chloroplast haplotype to *R. heleniifolium* represent the evidence that there was a chloroplast capture (i.e. chloroplast replacement by introgressive hybridisation) (see Fig. 4). The chloroplast capture is a very usual phenomenon in alpine plants (Kyrkou *et al.*, 2015 and references therein).

Forming a stable initial hybrid generation (i.e. the F_1) is a very difficult step, although natural hybridisation is widespread in plants. One hypothesis for solving this paradox is that the establishment of hybrid populations is facilitated by repeated opportunities for crossing and a relatively high fitness for certain hybrid genotypes (Arnold, 1997). We invoke this hypothesis for explaining how *R. scariosum* reached

complete homoploid hybrid speciation in sympatry and, once orphan of one parental taxon, still backcrossed with the other parental taxon (*R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium*) until floral asynchrony rose between them. The differences in substrate preference –ecological isolation– could also help in the establishment of *R. scariosum* as another escape mechanism of the homogenising effects of gene flow from parental species (Buerkle *et al.*, 2000).

The distribution pattern of the genetic diversity that we found for *R. scariosum* is totally congruent with that observed in other Alpine siliceous species. Several studies (e.g. Schönswetter *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2009; Thiel-Egenter *et al.*, 2011) have detected what they called break zones in the distributions of alleles within species. These break zones often coincide with areas of great altitudinal variation, which prevent (or hamper) the genetic exchange between populations. *Rhaponticum scariosum* localities we sampled are isolated by the Aosta Valley break zone (Thiel-Egenter *et al.*, 2011), a well-known boundary between the western and the eastern Alps, which was shown as a break for several silicicolous alpine plant taxa (Schönswetter *et al.*, 2005).

Origin of the Alpine taxa of Rhaponticum

Central-eastern haplotypes of *Rhaponticum scariosum* are very distant (Fig. 4) from western ones. Despite the fact of their being separated at the origin of the genus in the mid Miocene (~ 14 Mya), the Messinian salinity crisis (MSC) appears as a key process in *Rhaponticum* diversification. The cluster including oriental species diverged at the beginning of MSC (~7 Mya) and central-eastern *R. scariosum* haplotype was separated from North African haplotypes at the end of MSC (~5 Mya). The Alpine-Pyrenean clade diversified slightly after MSC (~4.5 Mya) and *R. scariosum* western haplotype separated from *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* during the Pleistocene (~2 Mya).

The polymorphic positions in ITS and ETS regions (Table S2) as well as their haplotypes relationship (Fig. 4) suggest that *R. scariosum* from the western Alps is a

321 taxon of homoploid hybrid origin and *R. heleniifolium* could be one of its parental
 322 species. Both show the same chromosome number ($2n=26$; Hidalgo *et al.*, 2007) and
 323 similar genome size (Hidalgo *et al.*, unpublished). These taxa belong to the clade
 324 comprising occidental species of *Rhaponticum* genus (Hidalgo *et al.*, 2006) which,
 325 according to our dating carried out on the basis of Barres *et al.* (2013), would have
 326 risen in the late Miocene and should have radiated during the Messinian salinity crisis
 327 (MSC) (Fig. 4). The effect of MSC and the onset of the Mediterranean climate are
 328 controversial and whilst in some lineages it promoted speciation and radiation, in
 329 others it triggered extinction (Fiz-Palacios & Valcárcel, 2013 and references therein).
 330 Nevertheless, a similar temporal gap of cladogenesis was found between 6.1 and 3.4
 331 Mya in 36 Mediterranean lineages (Fiz-Palacios & Valcárcel, 2013). The *Rhaponticum*
 332 genus origin was proposed from the Near East (Hidalgo *et al.*, 2006). Alpine
 333 *Rhaponticum* taxa would have risen later, in the middle Pleistocene (~ 2 Mya ago, Fig.
 334 4) in a secondary contact between lineages of the occidental and the oriental clade
 335 (this last one consists mostly of central Asian species; Hidalgo *et al.*, 2006). Dating also
 336 shows that *R. scariosum* from different Alps regions did not arise from the same point
 337 (Fig. 4). The shortest branch (of 2 Mya) dates the homoploid hybrid origin, whereas the
 338 longest would indicate incomplete lineage sorting (ILD) probably due to lineages which
 339 inhabited the Alps but became extinct because of climatic fluctuations. Strikingly, there
 340 are no *Rhaponticum* records in the entire Balkan Chain and central Europe; this gap in
 341 the genus distribution between the western Mediterranean region and the Caucasus
 342 could be related to this inferred lineage extinction. This is the most plausible
 343 interpretation given that *Rhaponticum* is not a genus with achenes adapted for long
 344 distance dispersal (taking into account their high weight and their small pappus), and
 345 historical hybridisation between species that were sympatric during the Pleistocene but
 346 are currently allopatric is more frequent than previously thought (Ikeda *et al.*, 2012).
 347 Interestingly, the sister group of the Alps clade in the chloroplast tree (Fig. 4) contains
 348 the invasive taxon *R. repens* that has recently reached the Iberian Peninsula (López-

Alvarado *et al.*, 2011). A similar pattern was reported for *Senecio inaequidens* DC., for which a historical hybridisation event reveals a past colonisation and extinction in Europe, and which last century experienced a second arrival into the region (Pelser *et al.*, 2012). Thus, a past arrival of *R. repens* or some taxa of its lineage to Europe could explain the chloroplast tree topology.

West-Alpine *Rhaponticum* appear to be related to *R. centauroides* from the Pyrenees in all regions analysed. Linkage between the southwestern Alps and Pyrenees is strongly supported by genetic studies (e.g. Schmitt, 2007). Unexpectedly, the two *R. heleniifolium* subspecies do not form a monophyletic clade. The little variability found inside each subspecies (only one haplotype per subspecies and no pattern of rDNA polymorphism between populations) could be the result of the bottleneck processes occurred during postglacial colonisations.

Concluding remarks

Rhaponticum taxa from the Alps are the result of current and past hybridisation and Mediterranean climate fluctuations from the Pliocene (the final of MSC) to Quaternary glaciations. *Rhaponticum heleniifolium* subsp. *heleniifolium* seems to be involved in *R. scariosum* homoploid hybrid origin, with both taxa still hybridising in the western Alps (where they cohabit), but with a very small frequency. This is due to floral asynchrony and differences in substrate preference, which virtually prevent these two taxa from overlapping in space and flowering time.

Despite their low germination rates, *Rhaponticum heleniifolium* subsp. *heleniifolium* and *R. scariosum* populations from the French Alps are not in danger. Some of these populations are even expanding in recent years (O. Hidalgo, field observations). This is probably related to the protection of their areas, which dramatically reduced herbivorous attacks, these being one of biggest threats for some *Rhaponticum* taxa (e.g. *R. canariense*; Carqué *et al.*, 2004).

This study also shows that natural hybridisation is not a threat for coexisting species of Alpine *Rhaponticum*, because barriers to gene flow have evolved during their coexisting time. In the case of *Rhaponticum*, habitat protection and the decrease of herbivorous pressure are enough for population recovery.

Acknowledgements

The authors thank Oriane Hidalgo, Jean-Marie Martin, Cédric Dantant and Dominique Vincent for collection assistance, Andreas Fleischmann and Botanische Staatssammlung München for providing us some providential herbarium specimens, and Daniel Vitales for advice on dating. This work was subsidised by MICINN (Spanish government; project CGL2010-22234-C02-01 and 02/BOS) and AGAUR (Catalan government, projects 2009SGR439 and 2014SGR514). GMdX benefited from a predoctoral ADR grant (Universitat de Barcelona).

References

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukhmanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczewski T, Mallet J, Martinez-Rodriguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfenning K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JBW, Zinner D. 2013. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 229–246.
- Alvarez N, Thiel-Egenter C, Tribsch A, Holderegger R, Manel S, Schönswetter P, Tarbelet P, Brodbeck S, Gaudeul M, Gielly L, Küpfer P, Mansion G, Negrini R, Paun O, Pellecchia M, Rioux D, Schüpfer F, Van Loo M, Winkler M, Gugerly F, IntraBioDiv Consortium. 2009. History or ecology? Substrate type as a major driver of spatial genetic structure in Alpine plants. *Ecology Letters* 12: 632–640.

405 **Anderson E, Stebbins GL. 1954.** Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution*
406 8: 378–88.

407 **Arnold MD. 1992.** Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of*
408 *Ecology, Evolution, and Systematics* **23**: 237–261.

409 **Arnold MD. 1997.** Natural Hybridization and Evolution. Oxford Univ. Press: New York.

410 **Barres L, Sanmartín I, Anderson CL, Susanna A, Buerki S, Galbany-Casals M,**
411 **Vilatersana R. 2013.** Reconstructing the evolution and biogeographic history of tribe
412 Cardueae (Compositae). *American Journal of Botany* **100**: 867–882.

413 **Buerkle CA, Morris RJ, Asmussen MA, Rieseberg LH. 2000.** The likelihood of
414 homoploid hybrid speciation. *Heredity* **84**: 441–451.

415 **Carqué E, Durbán M, Marrero M, Bañares A. 2004.** Influencia de los herbívoros
416 introducidos en la supervivencia de *Stemmacantha cynaroides* (Asteraceae). Una
417 especie amenazada de las islas Canarias. *Vieraea* **32**: 97–105.

418 **Cozzolino S, Nardella AM, Impagliazzo S, Widmer A, Lexer C. 2006.** Hybridization
419 and conservation of Mediterranean orchids: should we protect the orchid hybrids or
420 the orchid hybrid zones? *Biological Conservation* **129**: 14–23.

421 **Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012.** jModelTest 2: more models, new
422 heuristics and parallel computing. *Nature methods* **9**: 772–772.

423 **Dostál J. 1976.** *Leuzea* DC. in *Flora Europaea* vol. 4 (ed. Tutin TG, Heywood VH,
424 Burges NA, Moore DM, Valentine DHA, Walters SM, Webb DA) pp. 252–253.
425 Cambridge University Press, Cambridge.

426 **Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of
427 fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.

428 **Drummond AJ, Rambaut A. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by
429 sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 214.

- 430 **Ellis JR, Bentley KE, McCauley DE. 2008.** Detection of rare paternal chloroplast
 431 inheritance in controlled crosses of the endangered sunflower *Helianthus*
 432 *verticillatus*. *Heredity* **100**: 574–580.
- 433 **Fiz-Palacios O, Valcárcel V. 2013.** From Messinian crisis to Mediterranean climate: A
 434 temporal gap of diversification recovered from multiple plant phylogenies.
 435 *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **15**: 130–137.
- 436 **Golding GB, Strobeck C. 1983.** Increased number of alleles found in hybrid
 437 populations due to intragenic recombination. *Evolution* **37**: 17–29.
- 438 **Grant V. 1981.** Plant Speciation, 2nd ed. New York: Columbia Univ. Press.
- 439 **Greuter W. 2003.** The Euro+Med treatment of Cardueae (Compositae) – genèric
 440 concepts and required new names. *Willdenowia* **33**: 61.
- 441 **Greuter W. 2005.** Euro+Med Noturae, 1. *Willdenowia* **35**: 237–238.
- 442 **Greuter W, Aghababian M, Wagenitz G. 2005.** Vaillant on *Compositae*—systematic
 443 concepts and nomenclatural impact. *Taxon* **54**: 149–174.
- 444 **Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
 445 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–
 446 98.
- 447 **Hegarty MJ, Barker GL, Brennan AC, Edwards KE, Abbott RJ, Hiscock SJ.**
 448 **2008.** Changes to gene expression associated with hybrid speciation in plants:
 449 further insights from transcriptomic studies in *Senecio*. *Philosophical Transactions of*
 450 *the Royal Society B: Biological Sciences* **363**: 3055–3069.
- 451 **Hidalgo O. 2006.** El grupo *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae, Centaureinae):
 452 delimitación y filogenia. PhD Thesis, Universitat de Barcelona.
- 453 **Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Garnatje T, Susanna A. 2006.** Phylogeny of
 454 *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae) and related genera inferred
 455 from nuclear and chloroplast DNA sequence data: taxonomic and biogeographic
 456 implications. *Annals of Botany* **97**: 705–714.

457 **Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Garnatje T, Sussana A, Siljak-Yakovlev S. 2007.**
 458 Karyological evolution in *Rhaponticum* Vaill. (Asteraceae, Cardueae) and related
 459 genera. *Botanical Journal of the Linnean Society* **153**: 193–201.

460 **Huelsensbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP. 2001.** Bayesian Inference of
 461 Phylogeny and its Impact on Evolutionary Biology. *Science* **294**: 2310–2314.

462 **Huson DH, Bryant D. 2006.** Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary
 463 Studies. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 254–267

464 **Ikeda H, Carlsen T, Noriyuki F, Brochmann C, Setoguchi H. 2012.** Pleistocene
 465 climatic oscillations and the speciation history of an alpine endemic and widespread
 466 arctic–alpine plant. *New Phytologist* **194**: 583–594.

467 **Kyrkou I, Iriondo JM, García-Fernández A. 2015.** A glacial survivor of the alpine
 468 Mediterranean region: phylogenetic and phylogeographic insights into *Silene*
 469 *ciliata* Pourr. (Caryophyllaceae). *PeerJ* **3**: e1193.

470 **Kovařík A, Pires JC, Leitch AR, Lim KW, Sherwood AM, Matyasek R, Rocca J,**
 471 **Soltis DE, Soltis PS. 2005.** Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in
 472 two *Tragopogon* allopolyploids of recent and recurrent origin. *Genetics* **169**: 931–
 473 944.

474 **Linder CR, Goertzen LR, Vander Heuvel B, Francisco-Ortega J, Jansen RK. 2000.**
 475 The external transcribed spacer of the rDNA repeat: a new nuclear region for low-
 476 level taxonomic analysis of the Asteraceae and closely allied families. *Molecular*
 477 *Phylogenetics and Evolution* **14**: 285–303.

478 **López-Alvarado J, Crespo MB, Garcia-Jacas N, Alonso MA, Vilar L, Cristóbal JC,**
 479 **Susanna A, Martínez-Flores F, Juan A, Sáez L. 2011.** First record of the alien pest
 480 *Rhaponticum repens* (Compositae) in the Iberian Peninsula. *Collectanea Botanica*
 481 *(Barcelona)* **30**: 59–62.

482 **López-Pujol J, Garcia-Jacas N, Susanna A, Vilatersana R. 2012.** Should we
 483 conserve pure species or hybrid species? Delimiting hybridization and introgression

- 484 in the Iberian endemic *Centaurea podospermifolia*. *Biological Conservation* **152**:
 485 271–279.
- 486 **Marques I, Nieto-Feliner G, Draper Munt D, Martins-Loução MA, Fuertes-Aguilar,**
 487 **J. 2010.** Unraveling cryptic reticulate relationships and the origin of orphan hybrid
 488 disjunct populations in *Narcissus*. *Evolution* **64**: 2353–2368.
- 489 **Mas de Xaxars G, García-Fernández A, Barnola P, Martín J, Mercadé A, Vallès J,**
 490 **Vargas P, Vigo J, Garnatje T. 2015.** Phylogenetic and cytogenetic studies reveal
 491 hybrid speciation in *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* (Saxifragaceae). *Journal of*
 492 *Systematics and Evolution* **53**: 53–62.
- 493 **McDade L. 1990.** Hybrids and phylogenetic systematics. I. Patterns of character
 494 expression in hybrids and their implications for cladistic analysis. *Evolution* **44**:
 495 1685–1700.
- 496 **Nieto-Feliner G, Rosselló JA. 2007.** Better the devil you know? Guidelines for
 497 insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants.
 498 *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 911–919.
- 499 **Pelser PB, Abbott RJ, Comes HP, Milton JJ, Möller M, Looseley ME, Cron GV,**
 500 **Barcelona JF, Kennedy AH, Watson LE, Barone R, Hernández F, Kadereit JW.**
 501 **2012.** The genetic ghost of an invasion past: colonization and extinction revealed by
 502 historical hybridization in *Senecio*. *Molecular Ecology* **21**: 369–387.
- 503 **Rambaut A, Drummond AJ. 2009.** FigTree v 1.3.1. Available from
 504 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- 505 **Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. 2014.** Tracer v1.6, Available from
 506 <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- 507 **Rieseberg LH. 2001.** Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology*
 508 *& Evolution* **16**: 351–358.
- 509 **Rieseberg LH, Willis JH. 2007.** Plant speciation. *Science* **317**: 910–914.
- 510 **Schmitt T. 2007.** Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and
 511 postglacial trends. *Frontiers in Zoology* **4**: 11.

- Schönswetter P, Stehlik I, Holderegger R, Tribsch A. 2005.** Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps. *Molecular Ecology* **14**: 3547–3555.
- Simmons MP, Ochoterena H. 2000.** Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* **49**: 369–381.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* **94**: 275–288.
- Soltis DE, Soltis PS, Collier TG, Edgerton ML. 1991.** Chloroplast DNA variation within and among genera of the *Heuchera* Group (Saxifragaceae): Evidence for chloroplast transfer and paraphyly. *American Journal of Botany* **78**: 1091–1112.
- Soltis PS, Soltis DE. 2009.** The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 561–88.
- Stebbins GL. 1950.** *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- Stebbins GL. 1959.** The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society* **103**: 231–251.
- Swofford DL. 2003.** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology* **17**: 1105–1109.
- Thiel-Egenter C, Alvarez N, Holderegger R, Tribsch A, Englisch T, Wohlgemuth T, Colli L, Gaudeul M, Gielly L, Jogan N, Linder HP, Negrini R, Niklfeld H, Pellecchia M, Rioux D, Schönswetter P, Taberlet P, Van Loo M, Winkler M, IntraBioDiv Consortium, Gugerli F. 2011.** Break zones in the distributions of alleles and species in alpine plants. *Journal of biogeography* **38**: 772–782.

- 539 **Thyssen G, Svab Z, Malinga P. 2012.** Exceptional inheritance of plastids via pollen in
 540 *Nicotiana sylvestris* with no detectable paternal mitochondrial DNA in the progeny.
 541 *The Plant Journal* **72**: 84–88.
- 542 **Vitales D, Pellicer J, Vallès J, Garnatje T. 2013.** Estructura genética y germinación
 543 de semillas en poblaciones portuguesas de *Cheirolophus uliginosus* (Asteraceae):
 544 Implicaciones para su conservación. *Collectanea Botanica (Barcelona)* **32**: 21–31.
- 545 **Vitales D, Garnatje T, Pellicer J, Vallès J, Santos-Guerra A, Sanmartín I. 2014.** The
 546 explosive radiation of *Cheirolophus* (Asteraceae, Cardueae) in Macaronesia. *BMC*
 547 *Evolutionary Biology* **14**: 118.
- 548 **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of
 549 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J
 550 and White T (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic
 551 Press: San Diego, CA, pp 315–322.
- 552 **Zomová-Lihová J, Mandáková T, Kovaříková A, Mühlhausen A, Mummenhoff K,**
 553 **Lysak MA, Kovařík A. 2014.** When fathers are instant losers: homogenization of
 554 rDNA loci in recently formed *Cardamine ×shulzii* trigenomic allopolyploid. *New*
 555 *Phytologist* **203**: 1096–1108.
- 556
- 557
- 558
- 559
- 560
- 561
- 562
- 563
- 564
- 565
- 566

567 **Table 1.** Studied taxa, population codes* and locations of samples.

Taxa	Code	Location
<i>R. heleniifolium</i> subsp. <i>heleniifolium</i> <i>R. scariosum</i>	A	France, Hautes Alpes, Moline en Champsaur O. Hidalgo, G. Mas de Xaxars, D. Vincent 02/08/2013 (BC) C. Dantant, O. Hidalgo, T. Garnatje 13/09/2011 (BC)
<i>R. heleniifolium</i> subsp. <i>heleniifolium</i>	C	France, Hautes Alpes, Col de Gleize G. Mas de Xaxars, O. Hidalgo, T. Garnatje 01/08/2013 (BC) O. Hidalgo, T. Garnatje 14/09/2011 (BC) J-M Martin, O. Hidalgo 07/2005 (BC)
	D	France, Hautes Alpes, Ancelle, Piolit O. Hidalgo, T. Garnatje 14/09/2011 (BC)
	E	France, Hautes Alpes, Barcelonnette O. Hidalgo, T. Garnatje 15/09/2011 (BC)
	F	France, Hautes Alpes, Annot O. Hidalgo, T. Garnatje 15/09/2011 (BC)
	G	France, Hautes Alpes, Le Monêtier-les-Bains O. Hidalgo, T. Garnatje 15/09/2011 (BC)
	H	France, Hautes Alpes, Col de Lauzet O. Hidalgo, T. Garnatje 15/09/2011 (BC)
	I	France, Hautes Alpes, Aiguillette du Lauzet O. Hidalgo, T. Garnatje 15/09/2011 (BC)
<i>R. heleniifolium</i> subsp. <i>bicknellii</i>	O	Italy, Maritime Alpes, Monte Saccarello, Passo della Guardia O. Hidalgo, K. Romashchenko 06/2005 (BC)
<i>R. scariosum</i>	B	France, Hautes Alpes, Chaillol O. Hidalgo, T. Garnatje 13/09/2011 (BC)
	J	France, Hautes Alpes, Moline en Champsaur 2

		O. Hidalgo, G. Mas de Xaxars, D. Vincent 02/08/2013 (BC)
	K	France, Hautes Alpes, Moline en Champsaur 3 O. Hidalgo, G. Mas de Xaxars, D. Vincent 02/08/2013 (BC) J-M Martin, O. Hidalgo 07/2005 (BC)
	L	Switzerland, Hinterrhein, Splügen (M-Schuhwerk Nr. 98/189) F. Schuhwerk, K. H. Jung 20/08/1998
	M	Italy, Judikarische Alpen, Passo Croce Domini (M-Merxm. 26528) H. Merxmüller 25/09/1970
	N	Austria, Tirol, SW Obladis (M-Merxm. 17737) H. Merxmüller 20/07/1957

568

569 *The population codes are the same as used in Figure 1.

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

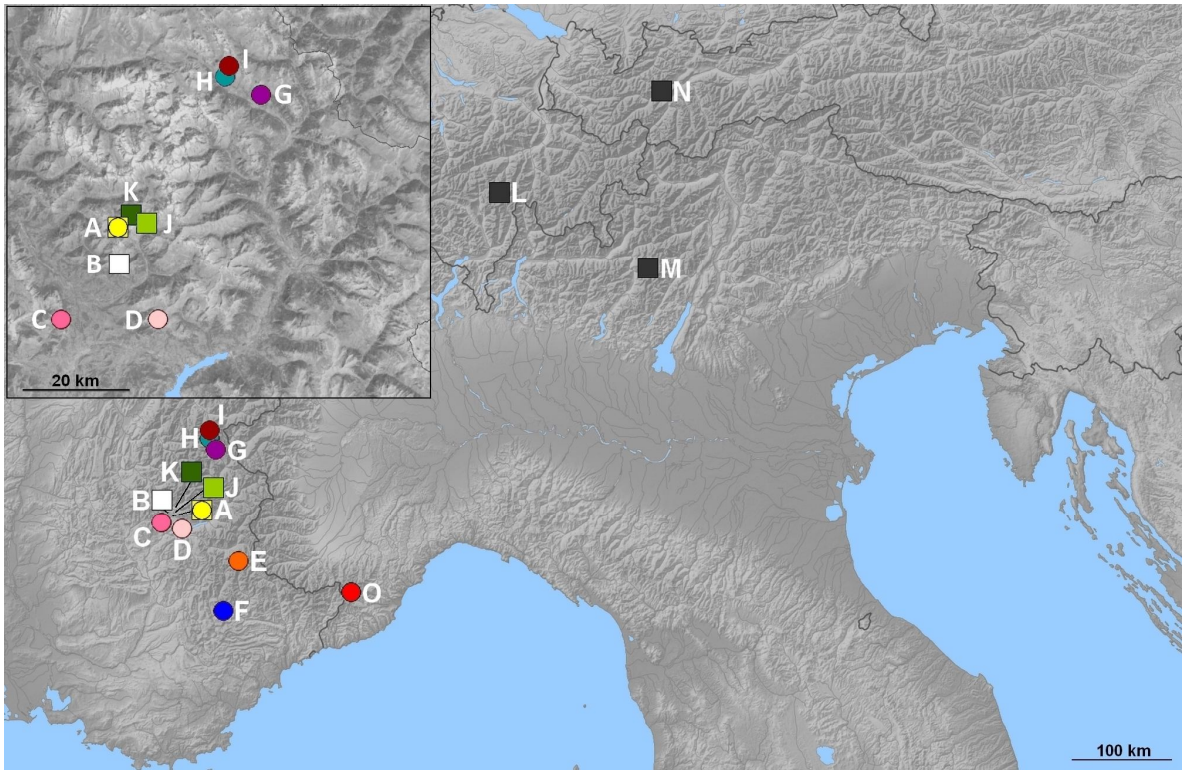


Figure 1. *Rhaponticum* locations sampled in Alps (circles and squares represent *R. heleniifolium* and *R. scariosum* populations, respectively). See Table 1 for population codes.

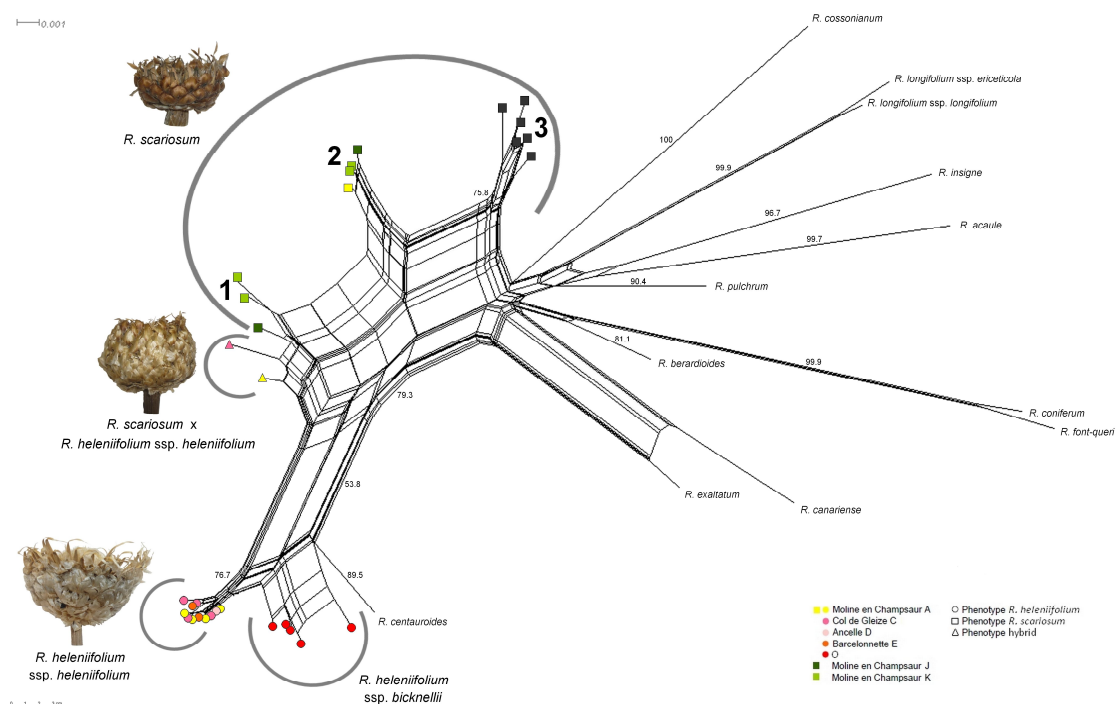
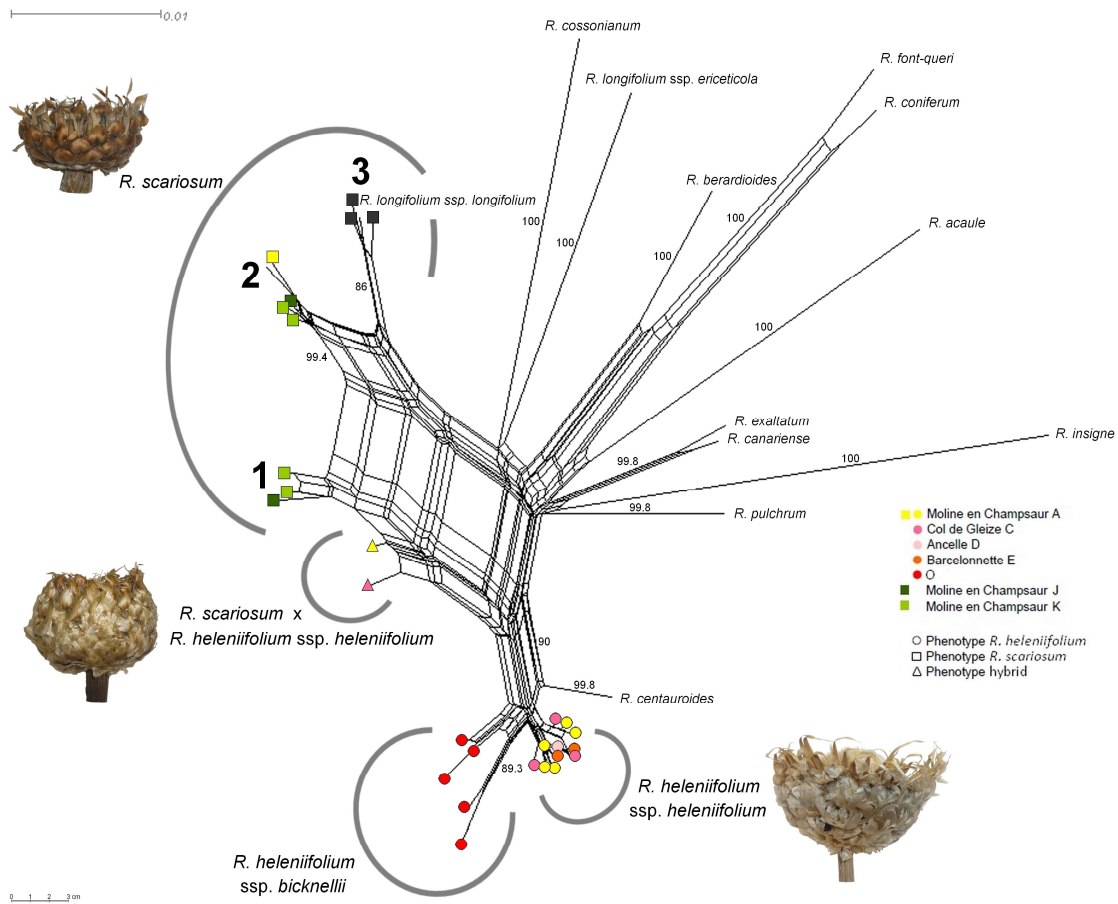


Figure 2. Network of ITS region obtained from species of occidental clade of *Rhaponticum*. See Table 1 for population codes.



620

621 **Figure 3.** Network of ETS region obtained from species of occidental clade of
622 *Rhaponticum*. See Table 1 for population codes.

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

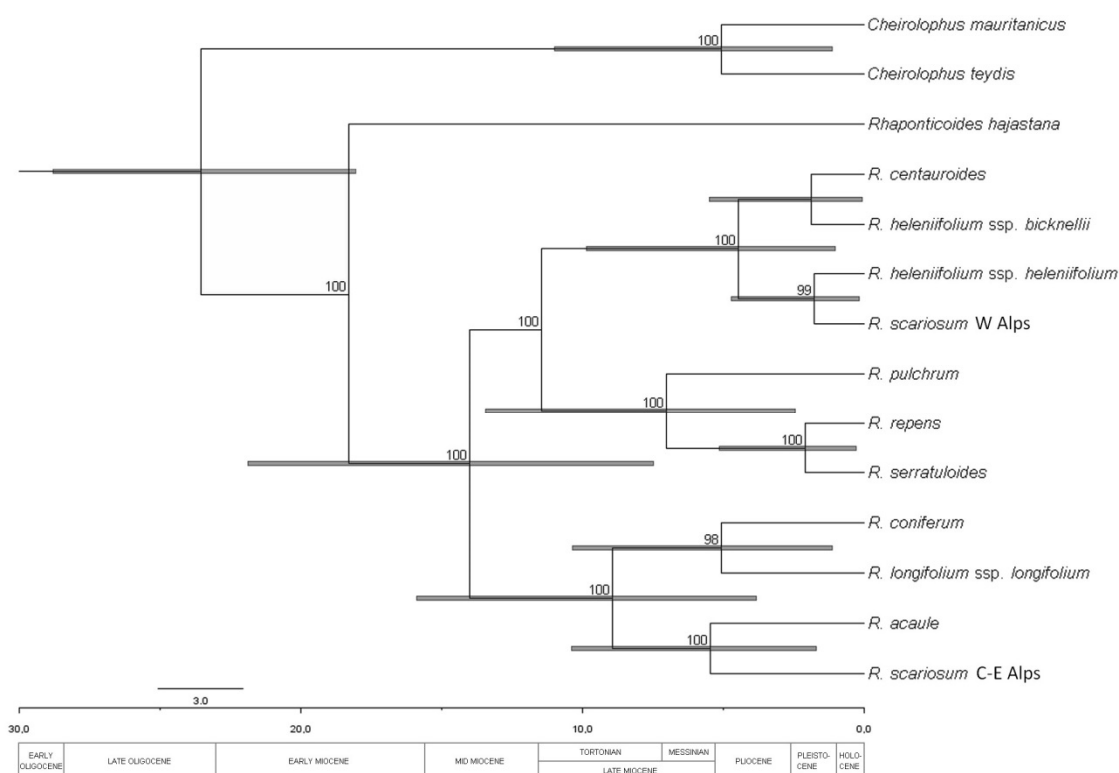


Figure 4. BEAST (Bayesian evolutionary analysis by sampling trees) maximum clade credibility (MCC) tree for *Rhaponticum* from the Alps and some representative taxa from the genus based on a chloroplast DNA data set (*rpl32-trnL*; *trnL-trnF*). 95% high posterior density (HPD) intervals are indicated by grey bars (for nodes with posterior probability > 0.5 in the BEAST analysis). The figures above the branches are the posterior probabilities obtained with the Bayesian inference analysis.

649 **Table S1.** Specimen herbarium vouchers and GenBank accession numbers for DNA sequences included in this study. See table 1 for
650 population codes. The first number refers to the mother plant and the second one to the seedling from this mother. All sequences were used in
651 Fig. S2. Sequences in bold were use to build Figs. 2 and 3.

Taxon	Voucher	ITS	ETS	<i>trnL-trnF</i>	<i>rp/32-trnL</i>
<i>Cheirolophus mauritanicus</i> (Font Quer) Susanna	MOROCCO, Romo 4617 (BC)	-	-	AY772303	JF754876
<i>Cheirolophus teydis</i> (C.Sm.) G.López	SPAIN, Susanna 1429 (BC)	-	-	AY772304	JF754877
<i>Rhaponticoides hajastana</i> (Tzvelev) M.V.Agab. & Greuter	ARMENIA, Susanna 1587 <i>et al.</i> (BC)	-	-	AY772279	JF754895
<i>Rhaponticum acaule</i> (L.) DC.	ALGERIA, Montserrat 2331 <i>et al.</i> (BC)	AY826334	DQ310995	AY772369	JF754897
<i>Rhaponticum berardioides</i> (Batt.) Hidalgo	MOROCCO, Hidalgo & Romo 12749 (BC)	DQ310948	DQ310998	-	-
<i>Rhaponticum canariense</i> DC.	SPAIN, Carqué Álamo s. n. (BC)	DQ310954	DQ311004	-	-
<i>Rhaponticum centauroides</i> (L.) O.Bolòs	SPAIN, Hidalgo 504 <i>et al.</i> (BC)	DQ310946	DQ310994	DQ310913	***
<i>Rhaponticum coniferum</i> (L.) Greuter	SPAIN, Font s. n. (BC)	AY826298	DQ310996	AY772337	JF754883
<i>Rhaponticum cossonianum</i> (Ball) Greuter	MOROCCO, Gómiz 17-IV-2003 (BC)	DQ310949	DQ310999	-	-
<i>Rhaponticum exaltatum</i> (Willk.) Greuter	SPAIN, Garcia-Jacas & Susanna 2434 (BC)	DQ310953	DQ311003	-	-
<i>Rhaponticum fontqueri</i> (Sauvage) Hidalgo	MOROCCO, Hidalgo & Romo 12621 (BC)	DQ310947	DQ310997	-	-
<i>Rhaponticum insigne</i> (Boiss.) Wagenitz	IRAN, Archibald 2034 (K)	DQ310944	DQ310992	-	-
<i>Rhaponticum longifolium</i> (Hoffmanns. & Link) Dittrich	PORTUGAL, Garcia-Jacas & Susanna 2436 (BC)	DQ310950	DQ311000	DQ310917	***
<i>Rhaponticum longifolium</i> subsp. <i>ericeticola</i> (Font Quer) Greuter	MOROCCO, Hidalgo, Romo 13168 & Soriano (BC)	Hidalgo <i>et al.</i> , unpubl.	Hidalgo <i>et al.</i> , unpubl.	-	-
<i>Rhaponticum lyratum</i> C.Winkl. ex Iljin	TAJIKISTAN, Konnov 16-VII-1965 (LE)	DQ310935	-	-	-
<i>Rhaponticum nitidum</i> Fisch. ex DC.	RUSSIA, Kalibernova 5676 <i>et al.</i> (LE)	DQ310937	-	-	-
<i>Rhaponticum pulchrum</i> Fisch. & C.A.Mey.	RUSSIA, Popova 326 <i>et al.</i> (LE)	DQ310943	DQ310991	DQ310910	KJ826183
<i>Rhaponticum repens</i> (L.) Hidalgo	UZBEKISTAN, Susanna <i>et al.</i> 2046 (BC)	-	-	AY772268	JF754869
<i>Rhaponticum scariosum</i> Lam.	SLOVENIA: loc. nat., Botanical Garden of	DQ310952	DQ311002	-	-

	Universitatis Labacensis 1994-180 (BC)				
	Botanical Garden of Minsk, Belarus 1/304-2000 (BC)	DQ310951	DQ311001	-	-
	France, Hautes Alpes, Chaillol (BC)	B ***	B ***		
	France, Hautes Alpes, Moline en Champsaur 2 (BC)	J1 *** , J2 *** , J3 *** , J4 *** , J5 *** , J6 *** , J7 *** , J8 *** , J9 *** , J10 *** , J11 *** , J12 *** , J13 *** , J14 *** , J15 *** , J16 *** , J17 ***	J1 *** , J7 *** , J9 *** , J10 ***	J9 ***	J9 ***
	France, Hautes Alpes, Moline en Champsaur 3 (BC)	K1 *** , K2 *** , K4 *** , K5 *** , K6 *** , K7 *** , K8 *** , K9 *** , K10 *** , K11 *** , K12 *** , K13 *** , K14 *** , K15 *** , K16 ***	K12 *** , K16 ***	-	-
	Switzerland, Hinterrhein, Splügen (M-Schuhwerk Nr. 98/189)	L1 *** , L2 ***	L1 ***	L1 ***	L1 ***
	Italy, Judikarische Alpen, Passo Croce Domini (M-Merxm. 26528)	M1 ***	-	-	-
<i>Rhaponticum serratuloides</i> (Georgi) Bobrov	Austria, Tirol, SW Obladis (M-Merxm. 17737)	N1 ***	-	-	-
	Botanical Garden of Cluj-Napoca 636-2001 (BC)	-	-	DQ310908	***
<i>R. heleniifolium</i> subsp. <i>heleniifolium</i>	France, Hautes Alpes, Col de Gleize (BC)	C1 *** , C1-2 *** , C2 *** , C2-1 *** , C2-7 *** , C3 *** , C3-2 *** , C3-5 *** , C3-6 *** , C3-9 *** , C4 *** , C4-6 *** , C4-9 *** , C4-27 *** , C5 *** , C6 *** , C6-25 *** , C7 *** , C7-11 *** , C7-16 *** , C7-23 *** , C8 *** , C8-2 *** , C8-6 *** , C8-7 *** , C8-11 *** , C8-22 *** , C8-23 *** , C8-29 *** , C9-25 *** , C9-30 *** , C10 *** , C10-3 *** , C10-9 *** , C10-11 *** , C11 *** , C12 *** , C13 *** , C14 *** , C15 *** , C16 *** , C17 *** , C18 *** , C19 *** , C20 *** , C21 *** , C22 *** , C23 *** , C24 *** , C25 *** , C26 *** , C27 *** , C28 *** , C29 *** , C30 *** , C31 ***	C2-1 *** , C4 *** , C4-6 *** , C4-9 *** , C4-27 ***	C2-1 *** , C4 *** , C4-6 *** , C4-9 *** , C4-27 ***	C2-1 *** , C4 *** , C4-6 *** , C4-9 *** , C4-27 ***
	France, Hautes Alpes, Ancelle, Piolit (BC)	D1 *** , D1-12 *** , D2-5 *** , D2-9 *** , D2-16 *** , D2-20 *** , D2-21 *** , D3 *** , D3-8 *** , D3-14 *** , D3-20 *** , D3-22 *** , D3-23 *** , D3-24 *** , D4 *** , D4-2 *** , D5 *** , D5-16 *** , D6 *** , D6-5 *** , D6-11 *** , D6-20 *** , D6-25 *** , D6-28 *** , D6-29 *** , D7 *** , D7-15 *** , D7-17 *** , D7-22 *** , D8 *** , D9 *** , D10 *** , D11 ***	D3-14 ***	-	-
	France, Hautes Alpes, Barcelonnette (BC)	E3 *** , E4 *** , E5 *** , E6 *** , E8 *** , E8-25 *** , E8-28 *** , E9 *** , E9-2 *** , E9-5 *** , E9-7 *** , E9-9 *** , E9-10 *** , E9-11 *** , E9-12 *** , E9-13 ***	E8-25 *** , E9-30 ***	-	-

		***, E9-15 ***, E9-16 ***, E9-18 ***, E9-19 ***, E9-21 ***, E9-22 ***, E9-23 ***, E9-24 ***, E9-25 ***, E9-29 ***, E9-30 *** , E10 ***, E10-3 ***, E10-7 ***, E10-12 ***, E10-25 ***			
	France, Hautes Alpes, Annot (BC)	F1 ***, F1-5 ***		-	-
	France, Hautes Alpes, Le Monétier-les-Bains (BC)	G1 ***, G2 ***		-	-
	France, Hautes Alpes, Col de Lauzet (BC)	H1 ***		-	-
	France, Hautes Alpes, Aiguillette du Lauzet (BC)	I1 ***, I2 ***, I3 ***, I4 ***, I5 ***, I6 ***, I7 ***, I8 ***		-	-
<i>R. heleniifolium</i> subsp. <i>bicknellii</i> (Briq.) Greuter	Italy, Maritime Alpes, Monte Saccarello (BC)	O1 *** , O2 *** , O3 *** , O4 ***, O5 ***, O6 *** , O7 ***, O8 *** , O9 ***, O10 ***	O1 *** , O2 *** , O3 *** , O6 *** , O8 ***	O3 ***	O3 ***
<i>R. heleniifolium</i> Gren. & Godr. subsp. <i>heleniifolium</i> <i>R. scariosum</i> Lam.	France, Hautes Alpes, Moline en Champsaur (BC) (mixed population)	A1 ***, A1-6 ***, A1-9 ***, A1-12 ***, A1-17 ***, A1-18 ***, A2 ***, A4-1 ***, A4-8 ***, A4-12 ***, A4-20 ***, A4-22 ***, A5-4 ***, A8-2 ***, A8-10 ***, A8-16 *** , A8-26 ***, A9-1 ***, A9-2 ***, A9-5 ***, A9-7 ***, A9-9 ***, A9-10 ***, A9-12 ***, A9-13 *** , A9-15 ***, A9-21 ***, A11-12 ***, A11-14 ***, A11-16 ***, A11-18 *** , A11-21 ***, A11-23 ***, A11-25 ***, A11-29 ***, A13-1 ***, A13-2 ***, A13-3 ***, A13-10 *** , A13-12 ***, A13-19 ***, A13-22 ***, A13-24 ***, A13-25 ***, A13-26 ***, A14-9 ***, A14-14 ***, A14-17 ***, A14-24 ***, A14-25 ***, A15-8 *** , A17-1 ***, A17-7 ***, A17-8 ***, A17-9 ***, A17-16 ***, A17-17 ***, A17-18 ***, A17-21 ***, A17-22 *** , A17-23 ***, A17-25 ***, A17-26 ***, A18-9 ***, A18-30 ***, A19-19 ***, A20 ***, A21 ***, A22 ***, A25 ***, A27 ***, A28 ***, A29 ***, A30 ***, A30-1 ***, A30-2 ***, A30-3 ***, A30-4 ***, A32 ***, A33 ***, A33-1 ***, A33-2 ***, A34 ***, A35 ***, A36 ***, A37 ***, A37-1 ***, A37-2 ***, A37-3 ***, A37-4 ***, A37-5 ***, A39 ***, A40 ***, A41 ***, A41-1 ***, A41-2 ***, A41-3 ***, A41-4 ***, A41-5 ***, A41-6 ***, A41-7 ***, A41-8 ***, A42 ***, A43 ***, A43-1 ***, A44 ***, A45 ***, A46 ***, A48 *** , A49 ***, A50 ***, A51 ***, A52 ***, A53 ***, A54 ***, A55 ***, A56 ***, A56-1 ***, A56-2 ***, A56-3 ***, A56-4 ***, A56-5 ***, A56-6 ***, A56-7 ***, A56-8 ***, A56-9 ***, A56-10 ***, A56-11 ***, A56-12 ***, A56-13 ***, A57 ***, A57-1 ***, A57-2 ***, A57-3 ***, A57-4 ***, A57-5 ***, A57-6 ***, A57-7 ***, A58 ***	A8-16 *** , A9-13 *** , A11-18 *** , A13-10 *** , A15-8 *** , A17-22 *** , A48 ***	-	-

Table S2. Polymorphic positions per taxa or group for the ETS and ITS concatenated regions (following IUPAC ambiguity code). Long = *R. longifolium* subsp. *longifolium*; Cent = *R. centauroides*; Scar3 = *R. scariosum* (group 3); Scar2 = *R. scariosum* Hautes Alps (group 2); Scar1 = *R. scariosum* Hautes Alps (group 1); Hybrid = *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* × *R. scariosum*; Bick = *R. heleniifolium* subsp. *bicknellii* Maritime Alps; Hel = *R. heleniifolium* subsp. *heleniifolium* Hautes Alps.

ETS+ITS	Long	Cent	Scar3	Scar2	Scar1	Hybrid	Bick	Hel
14	A	A	A	A	W	W	T	T
40	A	G	A	A	R/A	R	G	G
48	C	T	C	C	Y	Y	T	T
69	M	T	M	Y	Y	Y	T	T
70	A	A	A	R	R	R	A	A
83	C	T	C	C	Y	Y	T	T/Y
96	T	C	T	T	Y	Y	C	C
127	C	C	C	C	C	C	Y	C
138	T	C	T	T	Y	Y	C	C
147	T	C	T	Y/C	C	C	C	C
149	G	T	G	G	G	T/K	T	T
150	T	T	T	T	T	T	A	T
152	G	G	G	G	G	G	T	G
167	C	T	C	C	Y	Y	T	T
179	T	G	T	T	K/T	K	G	G/R
183	C	T	C	C	Y	Y	T	T
196	G	A	G	G	R	A/R	A	A
202	C	C	C	C	Y	C	C	C
203	G	G	G	G	G	G	T	G
207	C	T	C	C	C	C	C	C
208	G	G	G	G	G	G	A	G
219	G	G	G	G	G	G/R	G	R
228	C	C	C	C	C	C	Y	C
231	C	C	C	C	Y	C	C	Y/C
241	A	G	A	R	R	G	G	G
254	C	C	C	S/C	S/C	C	C	C
263	R	A	R	A	A	A	A	A
269	G	G	G	K	K	K	G	G
281	C	C	C	C	C	C	T	C
283	T	G	T	T	K	K	G	G
285	A	A	A	A	A	A/R	A	A/R/G
300	Y	C	C	C	C	C	C	C
344	C	T	C	C	C	Y	T	T
349	T	C	T	Y/C	C	C	C	C
375	Y	T	Y	T	T	T	T	T
408	C	C	Y	C	Y	Y	C	C
409	A	G	R	G	G	G	G	G

506	C	C	C	C	C	C	T	C
520	C	T	C	C	Y	Y	T	T
538	G	G	G	G	K	K	T	T/K
544	C	C	C	C	C	Y/C	C	C
556	G	G	G	G	G	G	-	G
557	A	A	A	A	A	A	-	A
599	T	T	T	T/Y	T	T/Y	T	T/Y
600	C	T	C	C	Y	Y	T	T
609	T	C	T	T	Y	Y	C	C
629	C	T	C	C	C	C	C	C
630	C	C	C	C	Y	Y/C	C	C/Y/T
643	G	G	R	R	G	G	G	G
647	-	T	-	-	-	-	-	-
648	-	G	-	-	-	-	-	-
649	-	C	-	-	-	-	-	-
656	C	T	C	C	Y/C	Y	T	T
677	G	G	G	K	K	G	G	G
678	C	C	C	Y	Y	C	C	C
684	T	T	W	W	W	T	T	T
685	C	T	C	C	Y	Y	T	T
689	R	A	R	R/A	A	A	A	A
707	C	T	C	C	Y	Y	T	T
716	A	T	A	A	W/A	W	T	T
725	C	C	C	M	M	C	C	C
732	A	A	A	W/T	W	W/A	A	A
737	T	C	T	T	Y	Y	C	Y/C
740	T	T	T	Y	Y	T	T	T
756	C	G	G	G	G	G	G	G
789	C	C	C	Y	C	C	C	C
791	G	G	G	G	G	G	G	G/R
795	C	T	C	C	Y	Y	T	T
799	C	T	C	C	Y	Y	T	T
804	T	T	T	Y	Y	T/Y	T	T
805	C	T	C	Y	Y	T/Y	T	T
809	C	C	C	C	C	C	C	C
822	C	C	C	M	C	C	C	C
848	G	G	G	R	G	R/G	G	G
851	T	T	T	Y/T	Y	T/Y	T	T
854	C	C	C	Y	Y	Y	T	Y/C
867	G	G	G	G	G	G	G	G
887	C	C	C	C	Y	C	C	C/Y
917	A	G	A	A	R/A	R	G	G
919	G	R	G	G	G	G	G	G
934	T	Y	C	C	C	C	C	C
938	T	C	C	C	C	C	C	C

940	C	C	S	C	C	C	C	C
943	C	C	Y	C	C	C	C	C
950	C	C	Y	C	C	C	C	C
951	G	G	G	G	G	G	R	G
960	C	C	C	C	Y	Y	C	T
966	A	W	A	A	A	A	A	A
972	C	T	C	C	Y/C	Y	T	T
975	T	T	T	T/W	T	T	T	T
1062	C	G	T	T	K	K	G	G
1064	T	T	T	Y	T/Y	Y	T	T
1065	T	A	Y	Y	M/H	W/H	A	A
1073	C	A	C	C	M	M	A	A
1074	C	T	C	C	C	C	C	C
1075	C	C	C	C	C	C	Y	C
1076	G	G	G	G	K	K	G	K
1081	C	C	C	Y	Y	Y/C	C	C
1086	T	C	C	C	C	C	Y	C
1106	A	T	T	T	T	T	T	T
1107	C	C	C	C	S	C	C	C/S
1120	C	C	C	C	C	C	Y	C
1251	C	T	C	Y	Y	Y	T	T
1252	C	T	C	Y	Y	Y	T	T
1283	G	G	G	G	G	G	R	G
1292	Y	C	C	C	C	C	C	C
1299	C	T	C	Y	Y	Y	T	T
1301	T	C	C	C	C	C	C	C
1303	C	T	C	Y	Y	Y/T	Y	T
1323	G	G	A	R	R	R	A	A
1337	C	T	C	Y	Y	Y	T	T
1352	G	G	R	G	G	G	G	G
1354	T	C	C	Y	Y	Y	Y	T
1357	C	C	C	C	Y	Y	C	Y
1367	C	C	C	Y/C	Y	C	C	C
1382	C	C	C	C	Y	Y	C	T
1417	G	G	G	R	G	R/G	G	G
1454	T	T	W	W	T	W/T	T	T
1459	A	T	A	W	W	W	T	T
1464	T	C	C	C	C	C	C	C
1470	C	C	C	Y	Y	C	C	C

659

660

661

662

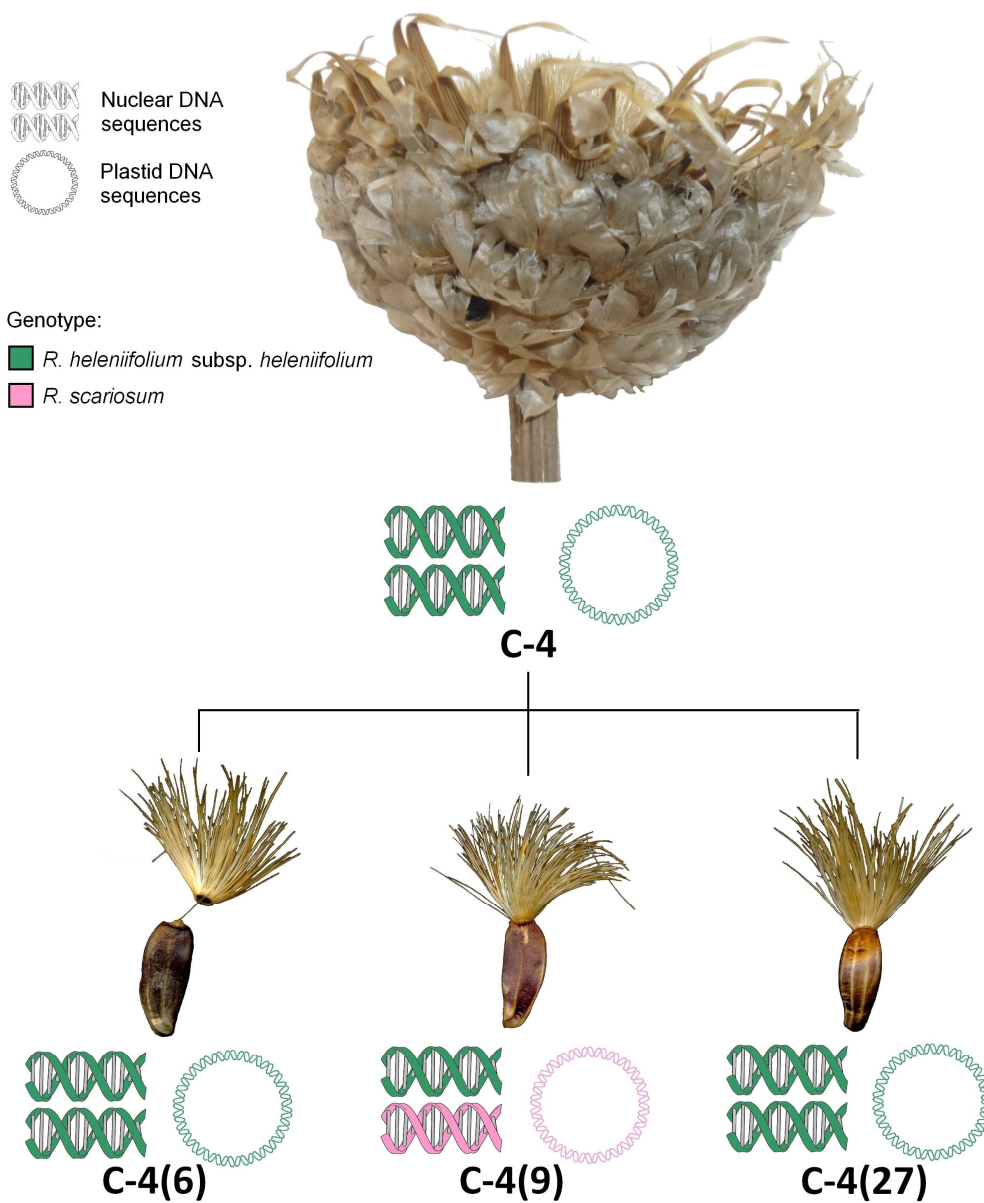
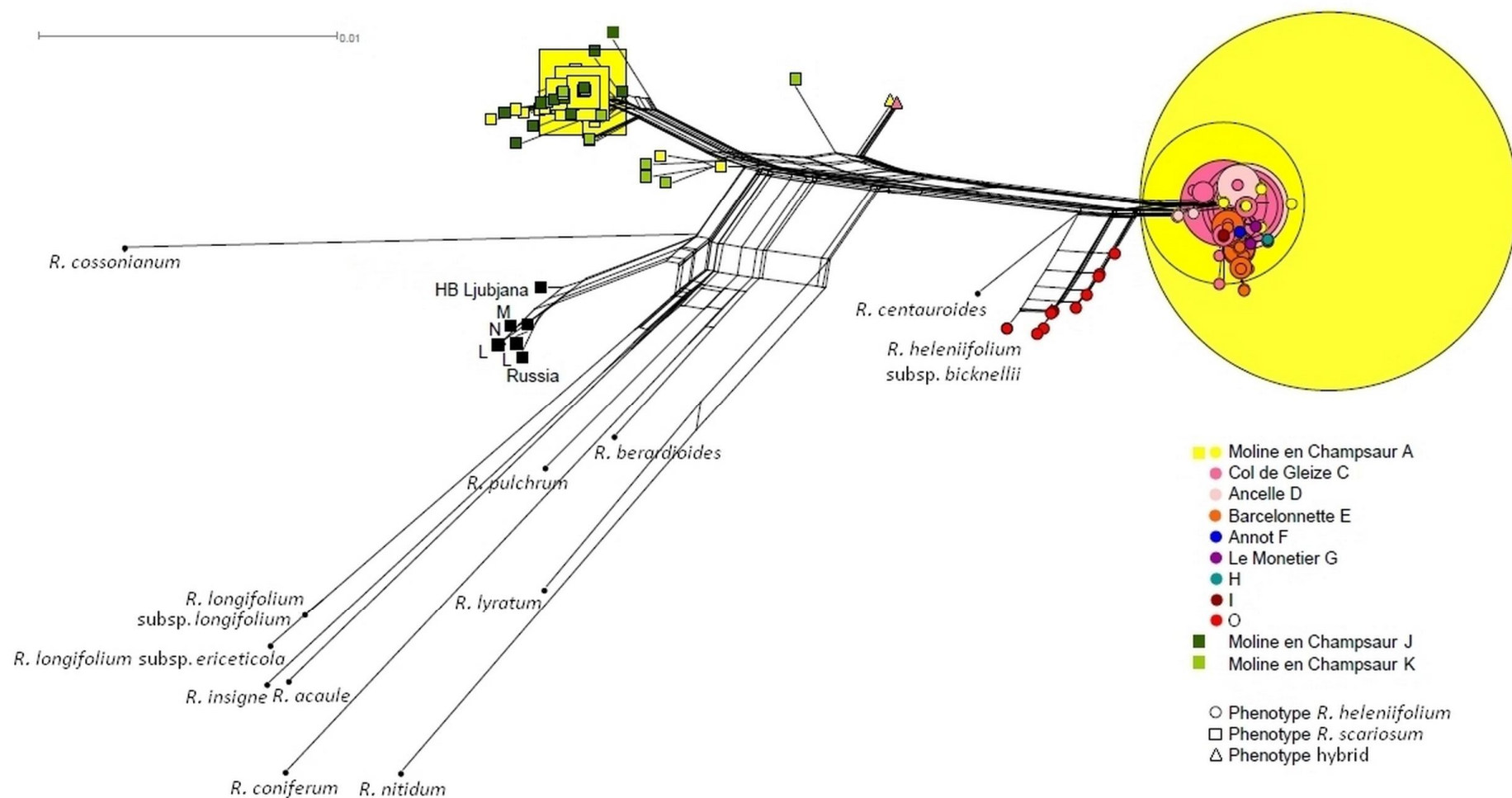


Figure S1. Mother capitulum (population 'C', Col de Gleize, individual 4) of a hybrid seedling and its siblings.

672 **Figure S2.** ITS network with all sequenced individuals studied plus *Rhaponticum* occidental taxa (see table S1 for individuals and accession numbers).



673

674


Impacte de la dispoloïdia i la poliploïdia en la diversificació de les espècies d'*Artemisia* (*Asteraceae*) d'alta muntanya i grups propers

Gemma Mas de Xaxars, Teresa Garnatje, Jaume Pellicer, Sonja Siljak-Yakovlev, Joan Vallès, Sònia Garcia

Alpine Botany: publicat en línia el 3 de novembre de 2015

La citogenètica molecular i l'estudi de la mida del genoma són eines que s'usen per tal d'entendre les relacions evolutives i sistemàtiques de moltes espècies. Aquest enfocament, no obstant, ha estat poc emprat en plantes alpines. Un bon model per a considerar canvis a nivell genòmic i cromosòmic és el grup dispoloide/poliploide d'espècies d'*Artemisia* d'alta muntanya, distribuït des de Sierra Nevada, a Europa, a les muntanyes d'Àsia central, passant pels Pirineus, els Alps i el Caucas. Són espècies petites i perennes, que sovint es troben en poblacions aïllades i que presenten distribucions altament disjunctes. Algunes estan considerades rares o, fins i tot, en perill. En aquest treball, mostrem els resultats per a 31 poblacions de nou espècies, incloent mida del genoma (valors $2C$), bandatge amb fluorocrom i hibridació *in situ* fluorescent (FISH) de gens de l'RNA ribosòmic (rDNA). S'ha trobat variació intraespecífica significativa en algunes poblacions d'*Artemisia eriantha* i *A. umbelliformis*, però aquesta no té significació taxonòmica per l'absència de diferenciació morfològica o ecològica. El nombre i la posició de bandes de DNA riques en bases GC pràcticament coincideix amb els dels marcatges de DNA ribosòmic, encara que en alguns tàxons hi ha, a més, expansió de zones heterocromàtiques riques en GC en els centròmers. S'han estimat els caràcters ancestrals i s'ha reconstruït $x=9$ com a condició basal, mentre que la condició dispoloide $x=8$ ha aparegut repetidament durant l'evolució del gènere *Artemisia*. En base a observacions citològiques, es proposen les translocacions robertsonianes com a mecanisme responsable de l'aparició de la dispoloïdia en el gènere. S'ha detectat una presència notable d'espècies amb nombre bàsic $x=8$ en el clade que inclou les espècies d'alta muntanya, la qual cosa realça l'important paper de la dispoloïdia en la diversificació de les espècies d'*Artemisia* de gran altitud. Per contra, la poliploïdia, tot i ser present entre les espècies alpines, és molt més comuna en la resta del gènere, particularment entre les espècies àrtiques. Es discuteixen hipòtesis sobre els mecanismes subjacents a la relativa abundància de dispoloides i l'escassetat de poliploides entre les espècies d'*Artemisia* d'alta muntanya.

Impact of dysploidy and polyploidy on the diversification of high mountain *Artemisia* (Asteraceae) and allies

Gemma Mas de Xaxars¹ · Teresa Garnatje² · Jaume Pellicer³ ·
Sonja Siljak-Yakovlev⁴ · Joan Vallès¹ · Sònia Garcia¹ 

Received: 22 April 2015 / Accepted: 23 October 2015
© Swiss Botanical Society 2015

Abstract Molecular cytogenetics and the study of genome size have been used to understand evolutionary and systematic relationships in many species. However, this approach has seldom been applied to alpine plants. A group of dysploid–polyploid high mountain *Artemisia* species, distributed from the European Sierra Nevada to Central Asian mountains, through the Pyrenees, the Alps and the Caucasus, is a good model to consider changes at the genome and chromosome levels. These small perennial *Artemisia*, found frequently in isolated populations, present highly disjunct distributions. Some are considered rare or even endangered. Here, we show results for nine species and 31 populations, including genome size (2C-values), fluorochrome banding and fluorescent in situ hybridisation of ribosomal RNA genes (rDNA). Significant intraspecific genome size variation is found in certain populations of *A. eriantha* and *A. umbelliformis*, but without taxonomic significance due to the absence of morphological or

ecological differentiation. The number and position of GC-rich DNA bands is mostly coincidental with rDNA although there is an expansion of GC-rich heterochromatin in centromeres in some taxa. Ancestral character states have been reconstructed and $x = 9$ is inferred as the likely ancestral base number, while the dysploid $x = 8$ has appeared repeatedly during the evolution of *Artemisia*. On the basis of cytological observations, Robertsonian translocations are proposed for the appearance of dysploidy in the genus. A remarkable presence of $x = 8$ -based species has been detected in the clade including high mountain species, which highlights the important role of dysploidy in the diversification of high mountain *Artemisia*. Conversely, polyploidy, though present in the alpine species, is more common in the rest of the genus, particularly in arctic species. Hypotheses on the mechanisms underpinning the relative abundance of dysploids and scarcity of polyploids in high mountain *Artemisia* are discussed.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:[10.1007/s00035-015-0159-x](https://doi.org/10.1007/s00035-015-0159-x)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sònia Garcia
soniagarcia@ub.edu

¹ Laboratori de Botànica – Unitat associada CSIC, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

² Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB), Passeig del Migdia s/n, Parc de Montjuïc, 08038 Barcelona, Catalonia, Spain

³ Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AB, UK

⁴ Laboratoire d'Evolution et Systématique, Université Paris Sud, UMR8079 CNRS-UPS-AgroParis-Tech, 91405 Orsay Cedex, France

Keywords Alpine plants · Base chromosome number · Chromomycin A₃ · Fluorescent in situ hybridisation · Genome size · Molecular cytogenetics · Ribosomal RNA genes · Robertsonian translocation

Introduction

High mountain communities are systems that endure harsh conditions, including extreme cold and fluctuating temperatures, exposure to snow, ice and strong winds, poor and rocky soils, high levels of UV radiation and little oxygen availability. Moreover, elevation gradients allow large environmental changes in short spatial distances (Nieto Feliner 2011). All these factors promote local adaptations which, coupled with processes such as long-term isolation

and secondary contacts, may lead to an increased biodiversity at high altitudes (Nagy and Grabherr 2009). Distribution areas of cold-adapted species were fragmented and restricted to higher elevations during interglacial periods, which created the current pattern of vicariant taxa between mountain tops in the Mediterranean Basin (Nieto Feliner 2014). In this regard, multiple glacial refugia have been identified in mountain ranges across Europe and North Africa, both in plants (Španiel et al. 2011) and animals (Canestrelli and Nascetti 2008).

Polyploidy and genome size studies in high mountain plants: state of the art

Several studies have hypothesised that high mountain plants undergo polyploidy more frequently (Löve and Löve 1949; Petit and Thompson 1999). It is thought that the ranges for polyploid species would include more extreme environments, such as high altitudes and latitudes, than their diploid relatives (Levin 2002; Weiss-Schneeweiss et al. 2013). However, the pattern stating the prevalence of polyploid taxa in alpine environments is still controversial. Besides, dysploidy (i.e. change in basic chromosome number, usually by fusion or fission, without a significant gain or loss of genetic material) has also contributed to the diversification of several alpine groups such as *Phyteuma* (Schneeweiss et al. 2013), *Saxifraga* (Mas de Xaxars et al. 2015) or *Leontopodium* (Russell et al. 2013) and, together with polyploidy, it is another important mechanism of karyotype evolution.

The C-value (i.e. genome size or the total amount of DNA in the unreplicated haploid or gametic nucleus) has been used in many taxonomic, systematic and evolutionary studies in a range of plant groups. Although genome size has been frequently correlated with environmental, phenotypic or ecological variables (see a review in Greilhuber and Leitch 2013), it has rarely been investigated in the context of high mountain communities. Albach and Greilhuber (2004) found significantly higher DNA amounts in alpine species from *Veronica*, while Mráz et al. (2009) found negative correlations with altitude and latitude in alpine populations of *Hieracium alpinum* L. Loureiro et al. (2013) explored genome size variation, beyond polyploidy incidence, in plants from two Spanish mountain ranges, finding no significant genome size differences or correlates. However, they stated that large genomes were difficult to find in high mountain environments.

***Artemisia* L. and its high mountain species**

Artemisia comprises about 500 species with a circumpolar and northern hemisphere distribution, with only a few species in South America and Africa (Tkach et al. 2008). The

fossil pollen record places the onset of differentiation of *Artemisia* back to the Early Miocene, about 19.8 Ma (Sanz et al. 2011). The main speciation and diversification centre of the genus is Central Asia, with secondary centres located in the Irano-Turanian and Mediterranean regions and in western North America (Vallès et al. 2011). *Artemisia* species are mostly perennial and particularly diverse in mountains, grasslands and semidesertic areas (Ling et al. 2006). The traditional classification of the genus, which relies on capitulum characters, is partially incongruent to lineages identified in molecular studies (Sanz et al. 2008). Nevertheless, the classical subgenera [*Artemisia*, *Ab-sinthium* (Mill.) Less., *Dracunculus* (Besser) Rydb., *Seriphidium* Besser ex Less., and *Tridentatae* (Rydb.) McArthur] are still widely used for the circumscription of the genus.

Within *Artemisia* two main basic chromosome numbers are recognised, $x = 9$ and $x = 8$, the former being the most common. Abundant karyological and cytogenetic information is available for the genus (for a review see Vallès et al. 2011). Polyploidy is common in the genus, ploidy levels have been found up to 16x and many species exist in polyploid series. Genome size variation has also been widely explored in *Artemisia*, which has become one of the best known genera in the family from this point of view.

A suitable model for studying the implications of genome size variation, dysploidy and polyploidy in the diversity and evolution of high mountain plants is found in a group of alpine *Artemisia*. This group is distributed from Sierra Nevada (Iberian Peninsula) to the Central Asian Mountains, through the Pyrenees, the Alps and the Caucasus. Some of the species associated with high elevations are currently considered as rare or endangered, such as *Artemisia granatensis*, endemic to Sierra Nevada. These small herbaceous perennials are usually found in isolated populations growing on siliceous rocky ledges or limestone substrates, often in crevices, at elevations between 1500 and 3400 m above sea level. Some taxa, such as *A. eriantha* and *A. umbelliformis*, show a highly disjunct distribution, reflecting the geographical complexity of the Pyrenees and the Alps (Sanz et al. 2014).

In the present study, we aim to explore genome size variation, ploidy and base chromosome number changes, and heterochromatin and rDNA loci evolution in alpine *Artemisia* and considering a phylogenetic context. Given the wealth of information currently available on the genus, we have the opportunity to address genome dynamics and evolutionary factors in this group of alpine plants. Our findings will contribute further evidence to shape the genomic/cytogenetic characteristics of alpine species. To fulfil these goals, two main questions have been specifically addressed: (1) is there any significant difference in basic chromosome number, genome size, heterochromatic or

rDNA distribution patterns in the high mountain *Artemisia* with respect to their lower altitude counterparts? and (2) are polyploidy and/or dysploidy more frequent in this group than in other non-high mountain *Artemisia*, and what is their biological significance? Additionally, and taking advantage of all available phylogenetic, cytogenetic and genome size information, we will infer the ancestral state of the studied features in this group and in the genus, and we will discuss the prevalence of ancestral states in the present-day high mountain *Artemisia*.

Materials and methods

Plant material

As part of an ongoing project focusing on the biogeography of two of the most abundant alpine *Artemisia* species, *A. eriantha* and *A. umbelliformis* (Sanz et al. 2014, Sanz et al. unpublished), samples of these as well as closely related species were collected to perform cytogenetic and genome size assays. All specimens were gathered from natural sites except one population of *A. eriantha* obtained via Index Seminum from the Alpine Botanical Garden of Lautaret (Hautes-Alpes, France), which had been formerly collected near the Col du Lautaret at 2300 m above sea level. Achenes were germinated in pots and cultivated in the greenhouse at the Faculty of Pharmacy, Universitat de Barcelona (UB). Vouchers have been deposited in the herbarium BCN, of the Centre de Documentació de Biodiversitat Vegetal, UB. Table 1 shows the populations studied. Figure 1 indicates the geographical locations of the populations assessed across the high mountain ranges. Seeds of *Pisum sativum* ‘Express Long’ and *Petunia hybrida* ‘PxPC6’ used as internal standard for flow cytometry measurements, were obtained from the Institut des Sciences du Végétal (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). Root tip meristems were obtained from seedlings produced by germinating achenes on wet filter paper in Petri dishes in the dark at room temperature.

DNA content assessments

DNA 2C-values of the selected species were estimated using flow cytometry. As outlined above, *P. sativum* and *P. hybrida* (2C = 8.37 and 2.85 pg, respectively; Marie and Brown 1993) were used as internal standards. We have analysed 29 populations of 8 species, with special emphasis on *A. eriantha* (12 populations) and *A. umbelliformis* (10 populations), because these are two of the most widely distributed species of this group. Young healthy leaf tissues from the species to be studied and the calibration standard were placed together in a plastic Petri dish and chopped in LB01 buffer (Doležel et al. 1989) with a razor blade. The suspension of nuclei was

filtered through a nylon mesh with a pore size of 70 µm and stained for 20 min with propidium iodide (60 µg/mL; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and supplemented with 100 µg/mL ribonuclease A (Boehringer, Meylan, France). More details on the methodology can be found in Garcia et al. (2006). Mean values and standard deviations were calculated based on the results for five individuals per population. Results on genome size have been submitted to the GSAD database (<http://www.asteraceagenomesize.com>).

Chromosome preparations

Root tips were pre-treated with 0.05 % aqueous colchicine, at room temperature, for 2.5–4 h. The material was fixed in absolute ethanol and glacial acetic acid (3:1) and then stored at 4 °C. Protoplast preparations for fluorochrome banding and fluorescent in situ hybridisation (FISH) were carried out using the air-drying technique of Geber and Schweizer (1987), with some modifications as explained in Garcia et al. (2007).

Fluorochrome banding and fluorescent in situ hybridisation

In order to reveal GC-rich DNA bands, chromomycin A₃ was used, following the protocol in Garcia et al. (2007). DNA hybridisation was carried out also following Garcia et al. (2007) with minor changes: the 18S-5.8S-26S rDNA probe was obtained from the clone pTa71 (Gerlach and Bedbrook 1979) and was labelled with direct Cy3 -red- (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK); the 5S rDNA probe was obtained from the clone pTa794 (Gerlach and Dyer 1980) and labelled with digoxigenin-11-dUTP-green-(Boehringer, Meylan, France). The preparations were counterstained with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), a mounting medium containing DAPI. FISH preparations were observed with an epifluorescent Zeiss Axiophot microscope with different combinations of Zeiss excitation and emission filter sets (01, 07 and 15). Hybridisation signals were analysed and photographed using the highly sensitive CCD camera (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA), and an image analyser software (Metavue, version 4.6, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Results on number and position of rDNA loci for each of the populations studied have been submitted to the Plant rDNA database (<http://www.plantrdnadatabase.com>).

Phylogenetic analyses and reconstruction of character evolution

Beyond the high mountain *Artemisia*, the sampling strategy for the phylogenetic analysis includes several complementary species to survey representative taxa across the different

Table 1 Provenance of the populations of *Artemisia* studied

Species	Origin	LatN long	PL ¹	2n ²	2C ³ (pg)	SD ⁴	2C ⁵ (Mbp)	1Cx ⁶ (pg)	Standard ⁷
<i>A. assoana</i> Balb.	Spain, Teruel, Puerto del Esquinazo	40°53'N 0°53'W	2	18	7.97	(0.11)	7475.86	3.98	<i>Petunia</i>
<i>A. eriantha</i> Ten.	Andorra, Ordino, Pic de Casamanya	42°34'N 01°33'E	2	18	6.17	(0.07)	6034.26	3.09	<i>Petunia</i>
	Bulgaria, Rila, Jostifika Mountain	42°00'N 23°30'E	2	18	6.24	(0.08)	6102.72	3.12	<i>Petunia</i>
	France, Alpes-Maritimes, Pas des Ladres	44°05'N 07°24'E	2	18	6.36	(0.08)	6220.08	3.18	<i>Petunia</i>
	France, Hautes-Alpes, Col du Galibier	45°03'N 06°24'E	2	18	5.72	(0.05)	5594.16	2.86	<i>Petunia</i>
	France, Hautes-Alpes, Col du Laurichard	45°06'N 06°24'E	2	18	6.33	(0.09)	6152.76	3.17	<i>Petunia</i>
	Greece, Epirus, Epiro Ploskos	39°58'N 20°46'E	2	18	5.93	(0.22)	5799.54	2.97	<i>Petunia</i>
	Greece, Tharsis, Mount Olympus	40°05'N 22°22'E	2	18	5.83	(0.24)	5701.74	2.92	<i>Petunia</i>
	Italy, Alpi Maritime, lake Ischiator	44°18'N 07°02'E	2	18	6.11	(0.15)	5975.58	3.06	<i>Petunia</i>
	Poland, Tatra Mountains, Liliowe Turnie	49°13'N 19°54'E	2	18	5.94	(0.22)	5809.32	2.97	<i>Petunia</i>
	Rumania, Dâmbovița, Bucegi-Caraiman	45°26'N 25°27'E	2	18	6.26	(0.21)	6122.28	3.13	<i>Petunia</i>
	Spain, Huesca, Ibón de Urdiceto	42°40'N 00°15'E	2	18	6.18	(0.14)	6044.04	3.09	<i>Petunia</i>
	Rumania, Argeș, Făgăraș	45°35'N 25°39'E	2	18	6.44	(0.35)	6259.68	3.22	<i>Petunia</i>
<i>A. genipi</i> Weber ex. Stechm.	Italy, Valle d'Aosta, Cogne de Scaletta	45°36'N 07°21'E	2	18	5.60	(0.09)	5476.80	2.80	<i>Petunia</i>
<i>A. glacialis</i> L.	Italy, Valle d'Aosta, Valnontey	45°35'N 07°20'E	2	16	8.52 ^a	(0.15)	8332.56	4.26	<i>Petunia</i>
	France, Alpes-Maritimes, Col de Tortisse	44°19'N 06°56'E	2	16	8.92	(0.41)	8723.76	4.46	<i>Petunia</i>
<i>A. granatensis</i> Boiss.	Spain, Granada, Sierra Nevada 1	37°05'N 03°23'W	2	16	7.43	(0.11)	7266.54	3.72	<i>Petunia</i>
	Spain, Granada, Sierra Nevada 2	37°80'N 03°24'W	2	16	7.61	(0.15)	7442.58	3.81	<i>Petunia</i>
<i>A. melanolepis</i> Boiss.	Iran, Māzandarān, Elburz Mountains	36°04'N 51°44'E	2	16	8.04	(0.18)	7863.12	4.02	<i>Petunia</i>
<i>A. nitida</i> Bertol.	Italy, Alpi Apuane, Monte Macina	44°04'N 10°14'E	6	54	18.40	(0.14)	17259.2	3.06	<i>Pisum</i>
<i>A. splendens</i> Willd.	Iran, Āzarbāijān-e Gharbī, Doughron mountains	38°44'N 46°40'E	4	32	13.59 ^b	(0.21)	13291.02	3.40	<i>Pisum</i>
<i>A. umbelliformis</i> Lam.	France, Alpes-Maritimes, Col de la Bonette	44°20'N 06°48'E	4	34	13.18	(0.19)	12899.82	3.30	<i>Pisum</i>
	France, Alpes-Maritimes, Col de Tortisse	44°18'N 06°57'E	4	34	13.03	(0.22)	12743.34	3.26	<i>Pisum</i>
	France, Hautes-Alpes, Col du Galibier	45°02'N 06°14'E	4	34	13.21	(0.08)	12919.38	3.30	<i>Pisum</i>
	France, Pyrénées-Orientales, Canigó	42°31'N 02°28'E	4	34	13.10	(0.18)	12811.8	3.28	<i>Pisum</i>
	Italy, Valle d'Aosta, Valnontey	45°35'N 07°20'E	4	34	13.40	(0.10)	13105.20	3.35	<i>Pisum</i>
	Spain, Catalonia, Girona, Noucreus	42°25'N 02°09'E	4	34	12.94	(0.42)	12650.49	3.23	<i>Pisum</i>
	Spain, Granada, Sierra Nevada 3	37°48'N 03°14'W	4	34	13.18	(0.12)	12890.04	3.30	<i>Pisum</i>
	Spain, Huesca, Collaradeta	42°44'N 00°31'W	4	34	12.40 ^b	(0.25)	12127.20	3.10	<i>Pisum</i>
	Spain, Palencia, Aguja de Cardaño	43°01'N 4°43'W	4	34	13.27	(0.06)	12978.06	3.32	<i>Pisum</i>
	Switzerland, Valais, Riffelberg	45°59'N 6°45'E	4	34	13.44	(0.05)	13144.32	3.36	<i>Pisum</i>

(1) Ploidy level; (2) chromosome number; (3) genome size in pg; (4) standard deviation; (5) genome size in Mbp (1 pg = 978 Mbp; Doležel et al. 2003); (6) monoploid genome size; (7) internal standard: *Petunia hybrida* 'PXP6' (2C = 2.85 pg), *Pisum sativum* 'Express Long' (2C = 8.37 pg). Genome size data from: ^a Garcia et al. (2004); ^b Torrell and Vallès (2001). Chromosome numbers confirmed and/or extracted from the Index to Chromosome numbers in Asteraceae (http://www.lib.kobe-u.ac.jp/infolib/meta_pub/G0000003asteraceae_e) except for *Artemisia melanolepis* (new count)

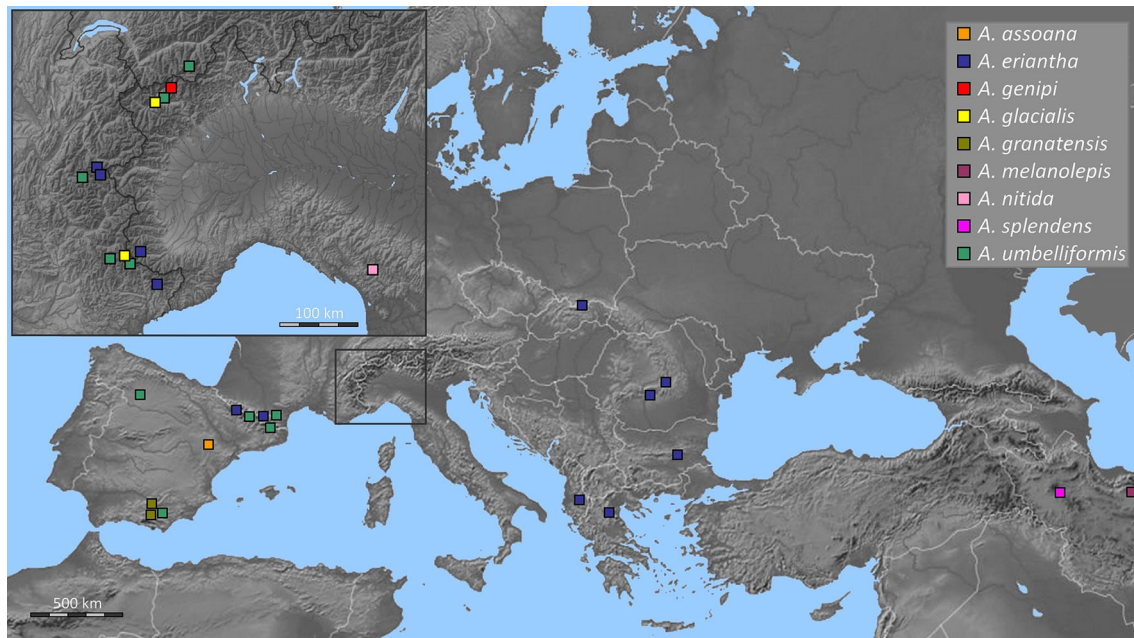


Fig. 1 Map indicating the provenance of the populations studied. Zoomed area in the *upper left corner* corresponds to the Alps, where many of the populations studied are present

recognised subgenera in *Artemisia*, bearing in mind availability of previous cytogenetic and genome size (2C-values) data. Species of *Argyranthemum*, *Nipponanthemum* and *Tanacetum* were selected as outgroups based on phylogenetic results of Sanz et al. (2008) and Zhao et al. (2010), and the availability of complete cytogenetic and genome size information. The nuclear ITS1 + ITS2 (470 bp) and the ETS sequences (374 bp), downloaded from GenBank (Supplementary Materials S1 and S2), and the newly generated ETS sequence for *A. genipi* (KT954132), were manually edited and concatenated using BioEdit v. 7.1.3.0 (Hall 1999). For phylogenetic analyses, only the 3' end of the ETS region was used due to the existence of subrepeats and indels causing alignment problems. Bayesian phylogenetic analysis was performed in MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) using the SYM + G model previously determined from jModeltest v. 2.1.3 (Darriba et al. 2012) under the Akaike information criterion (Akaike 1979). The Markov chain Monte Carlo (MCMC) sampling approach was used to calculate posterior probabilities (PPs). Four consecutive MCMC computations were run for 2,000,000 generations, with tree sampling every 100 generations. The first 1000 samples were discarded as the burn-in period. PPs were estimated through the construction of a 50 % majority-rule consensus tree.

The ancestral character reconstructions were performed with Mesquite v. 3.02 software (Maddison and Maddison 2015). All taxa included in these analyses were diploid in order to avoid the bias of polyploidy in the estimated nuclear DNA contents and number of rDNA sites. The 50 %

majority-rule consensus tree resulting from Bayesian Inference analysis was used as the input tree file (after pruning polyploid taxa). Basic chromosome numbers ($x = 8$ and $x = 9$) and the number of rDNA sites were transformed into categorical data (discrete and ordered). Ancestral states using the “trace character history” function were then inferred using maximum likelihood under the Mk1 model, in which all changes are equally probable, following the same approach as Vaio et al. (2013). For reconstructing the ancestral holoploid genome sizes (2C), we selected squared-change maximum parsimony as implemented for continuous characters in Mesquite. This approach has been widely used to reconstruct ancestral genome size states in many plant groups (e.g. Burleigh et al. 2012).

Statistical analyses

Analyses of regression and one-way ANOVA (or alternatively the Kruskal–Wallis test), Shapiro–Wilk test for normality and Barlett’s test for equality of variances were performed with RStudio, v.0.98.1078, a user interface for R (<http://www.rstudio.com>). Additionally, to analyse variation of the basic chromosome number, holoploid genome sizes, number of chromomycin A₃ positive (CMA+) bands and of rDNA sites in a phylogenetic context, the phylogenetically based generalised least squares (PGLS) algorithm, as implemented in the *nlme* package for R (Version 3.1-118), was used (Pinheiro et al. 2015). Data on holoploid genome size and ribosomal DNA loci for the complementary and outgroup species were extracted from the Genome

Size in the Asteraceae Database (<http://www.asteraceagenomesize.com>) and the Plant rDNA database (<http://www.plantrdnadatabase.com>).

Results

Genus *Artemisia* is well known from the molecular cytogenetic perspective, yet the large subgenus *Absinthium* and, in particular, the group of taxa inhabiting high mountains, had not been the focus of any cytogenetic research so far. With the present study, known genome size and molecular cytogenetic profiles of *Artemisia* span up to 32 and 10.4 % of the accepted taxa, respectively (531 taxa according to The Plant List Version 1.1 <http://www.theplantlist.org>, accessed March 13th, 2015).

Phylogenetic placement of high mountain *Artemisia*

The nuclear ribosomal DNA original dataset included 73 *Artemisia* species selected to provide a good representation of all subgenera (Vallès et al. 2011). The concatenated aligned dataset consisted of 844 characters (bp), excluding the 5.8S gene. According to our phylogenetic reconstruction (Fig. 2 and Supplementary Material S2), all high mountain taxa, except *A. atrata*, are grouped in a strongly supported clade (PP = 100 %) that also includes other members of subgenera *Absinthium* and *Artemisia*. For simplicity, we have named this group ‘high mountain and allies’ (HMA clade hereafter). When polyploid species are pruned from the tree, 52 species are retained and the HMA clade still retains statistical support (PP = 99 %).

Basic chromosome numbers

Our sample contains representatives of the main basic numbers of the genus ($x = 8$ and $x = 9$) and from the diploid to the hexaploid level. For both the genus and the HMA clade $x = 9$ has been reconstructed as the ancestral chromosome number, while $x = 8$ has appeared independently in the three main clades of the phylogeny (Fig. 2). In particular, $x = 8$ has arisen repeatedly in the HMA clade, with 50 % of its members having this basic chromosome number. Overall, comparing the number of $x = 8$ species with the number of $x = 9$ species, the incidence of the former is significantly higher in this clade than elsewhere in the genus ($F_{2,59} = 5.397$, $p = 0.007$).

Genome size variation and relationship with dysploid karyotypes

Table 1 provides holoploid genome size results (2C-values) obtained in the species studied, and a plot illustrating mean

genome sizes of $x = 8$ and $x = 9$ based *Artemisia* is presented in Supplementary Material S3. Results range from 5.6 pg for the diploid *A. genipi* to 18.4 pg for the hexaploid *A. nitida*, which means a global 3.28-fold range, with a 1.59-fold at the diploid level. The low HPCV (half peak coefficient of variation corresponding to ten samples of five different individuals) mean value (3.22 %) indicates good quality of the flow cytometric assessments. Intraspecific (interpopulation) differences have been detected in cases in which several populations were assessed, reaching up to 11.26 % in diploid *A. eriantha* and 8.39 % in the tetraploid *A. umbelliformis*. Within these species, several populations (those usually with values at the limits of the range) had significantly different genome sizes ($F_{11,40} = 5.882$, $p < 0.0001$ for the populations of *A. eriantha* and $F_{9,40} = 10.963$, $p < 0.0001$ for the populations of *A. umbelliformis*). Two populations of each for *A. glacialis* and *A. granatensis* were also measured, but differences were small, 1.48 % and 2.42 %, respectively.

Using the phylogenetically generalised least squares method (PGLS) we have observed that holoploid genome size (2C) is significantly and positively correlated with ploidy level ($t_{2,47} = 8.345$, $p = 0.0039$) and chromosome number ($t_{2,47} = 8.358$, $p = 0.023$), as expected, while monoploid genome size (1Cx) decreases significantly with both ($t_{2,47} = -1.680$, $p = 0.0000$; $t_{2,47} = -1.631$, $p = 0.0000$, respectively), indicating a certain degree of genome down-sizing. There is an approximate genome size reduction of 13 and 20 % at the 4x and 6x levels, respectively.

Fluorochrome banding (GC-rich heterochromatin) and rDNA loci

Results of chromomycin A₃ (CMA+) banding, indicative of GC-rich bands, and rDNA FISH are presented in Figs. 3 and 4. The number of CMA+ signals in one population of *A. eriantha* and *A. genipi* is four, while in another population of *A. eriantha* it is eight, all located at terminal position and overlapping with rDNA sites. *Artemisia umbelliformis* presents six terminal sites, although one faint centromeric signal is also visible. *Artemisia melanolepis* chromosomes bear five to six terminal sites, while the closely related tetraploid *A. splendens* displays eight CMA+ signals. The remaining species display much more CMA+ signals, some of them being particularly abundant in pericentromeric position. This is the case for *A. glacialis*, showing up to 20 CMA+ signals out of which 18 are pericentromeric, and *A. assoana* with 16–18 visible CMA+ bands, out of which at least 12 are pericentromeric. *Artemisia nitida* shows c. 50 CMA+ bands although few are pericentromeric in this case. DAPI after FISH has resulted in signals at both chromosome ends in most chromosomes of *A. glacialis* and *A. assoana*, and in some of *A. nitida*.

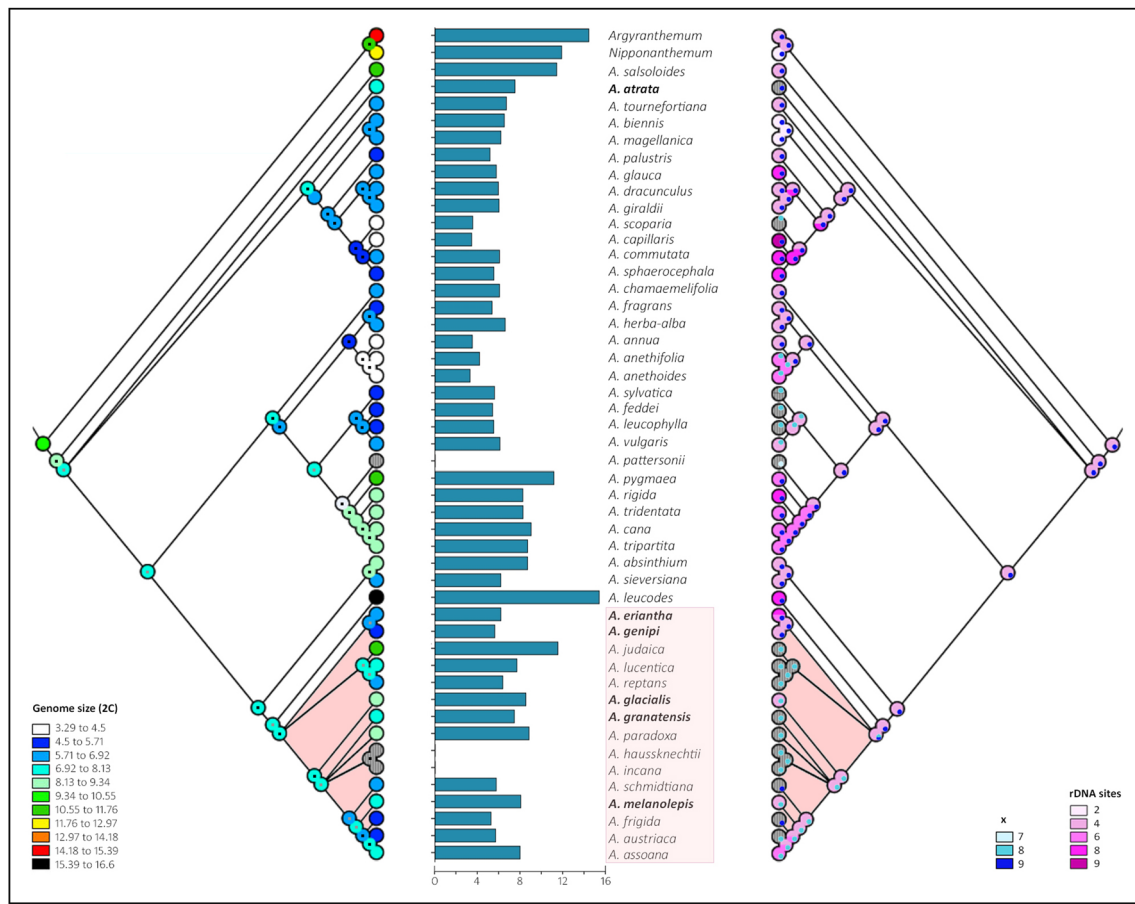


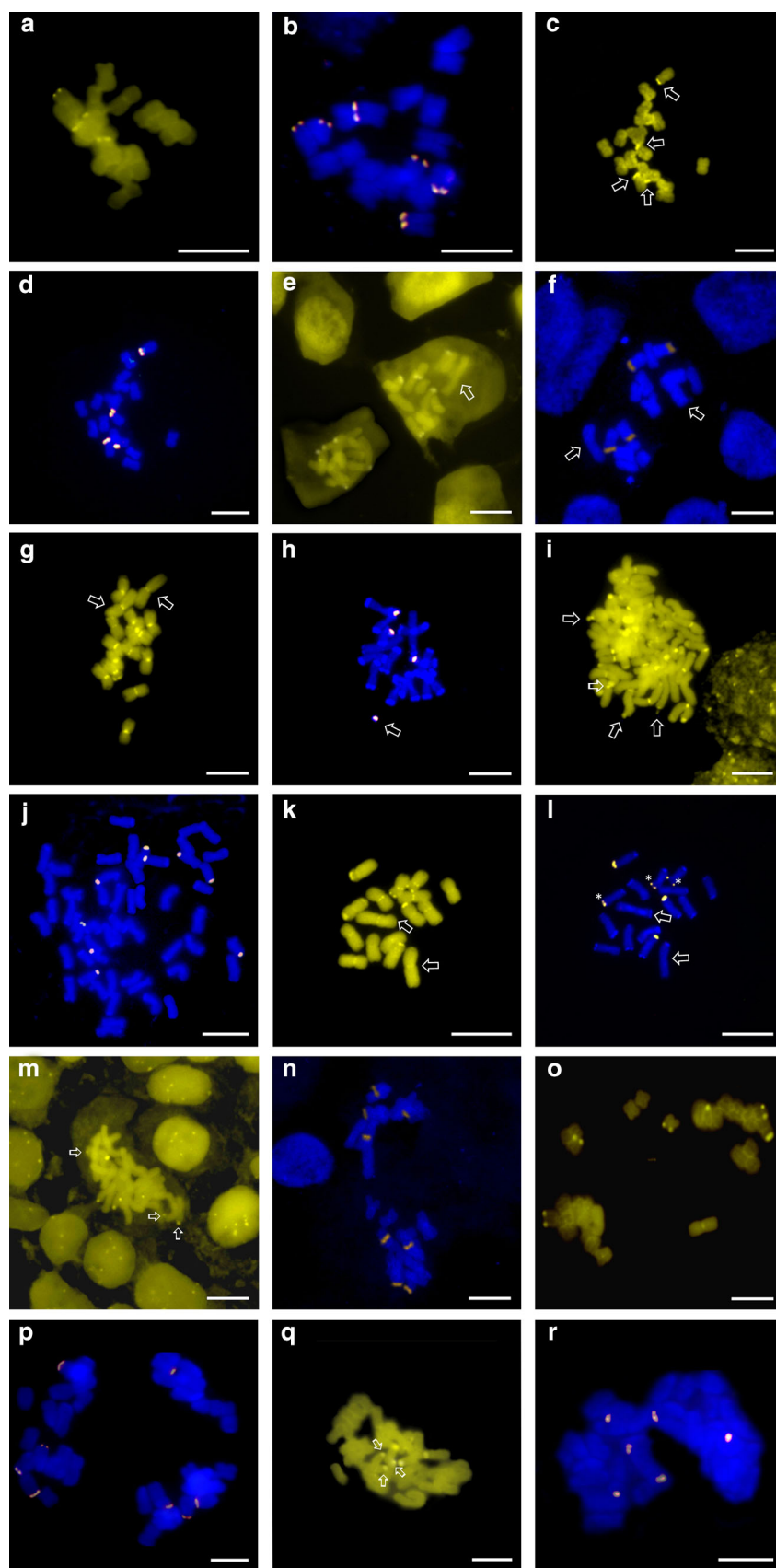
Fig. 2 Ancestral state reconstruction of genome size (left) and basic chromosome number and number of rDNA sites (right) for diploid *Artemisia* taxa. The HMA clade is highlighted in pink and the strictly high mountain species in bold. Species for which no data are available indicated in striped grey. Ancestral state reconstruction was estimated by Mesquite (v.3.02) using the 50 % majority-rule consensus

topology obtained by Bayesian inference phylogenetic analysis of the ITS1, ITS2 and ETS data sequence. The Bayesian clade-credibility values are indicated as grey and black squares (posterior probability >0.7 and >0.95, respectively). Blue bars depict genome sizes (2C values)

For rDNA loci, our results (Table 2) show a homogenised L-type organisation of ribosomal RNA genes, in which all rDNA sites, in all species, present overlapping 5S and 35S signals, thus both rRNA genes colocalise in the same loci. Perfect coincidence between the number of rDNA sites and the number of CMA+ bands is only seen, however, in *A. eriantha* (Fig. 4), *A. genipi* (Fig. 3c, d) and in *A. splendens* (Fig. 3m, n), while in another *A. eriantha* (Fig. 3a, b, corresponding to the Lautaret population) and in *A. umbelliformis* (Fig. 3o, p) not all rDNA sites are located in CMA+ regions, and in *A. melanolepis*, *A. glacialis*, *A. nitida* and *A. assoana* there are more CMA+ bands than rDNA sites—in the last three cases many more (Fig. 3g, i, k). The number of sites ranges from four to eight at the diploid, six to eight at the tetraploid, and nine at the hexaploid levels. The position of signals is invariably terminal and its number is constant within a population except for *A. eriantha* and *A. umbelliformis*, in which individuals presenting six and eight rDNA sites have been found; in one *A. eriantha* a small and

unpaired chromosome shows an rDNA site at each end (Fig. 4). As for genome size, the number of rDNA sites is positively correlated with chromosome number ($F_{1,62} = 82.06$, $p < 0.0001$) and ploidy level ($F_{1,62} = 79.18$, $p < 0.0001$), and both for the whole genus and for the HMA clade (the distribution of ploidy levels in *Artemisia* is presented in Fig. 5). Also, there is a significant ($F_{1,46} = 4.767$, $p = 0.0341$) reduction of the number of rDNA sites per chromosome complement with increasing ploidy. Considering data from all the diploid and tetraploid *Artemisia* known until present (mean $2C = 2.63$ vs. $2C = 1.93$ in $2x$ and $4x$, respectively), 26.6 % overall loci loss has been found. The number of sites per monophloid genome in *Artemisia* is gradually reduced at higher ploidy levels: hexaploids present a 33.5 % reduction in number of loci per monophloid genome with respect to the diploids, and the highest polyploids (decaploids) have 35.36 % less loci than the diploids. Finally, several species show considerable site size differences, such as *A. assoana* (Fig. 3l) and *A.*

Fig. 3 Chromomycin A₃-positive (CMA+) and FISH pictures of metaphases of *Artemisia* species from the HMA clade. **a, b** *A. eriantha*, $2n = 18$ (Urdiceto); **c, d** *A. genipi* $2n = 18$; **e, f** *A. melanolepis* $2n = 16$; arrows in **c** indicate CMA+ signals; arrow in **e** indicates one large chromosome; **g, h** *A. glacialis* $2n = 16$; arrows in **g** indicate a large chromosome pair and in **h** a detached ribosomal DNA locus; most CMA+ signals are pericentromeric in **g** (**i, j**) *A. nitida* $2n = 54$; arrow in **i** indicates probably decondensed rDNA loci; **k, l** *A. assoana* $2n = 16$; arrows in **k** and **l** indicate a large chromosome pair, and asterisks in **l** mark loci with low rDNA copy number; **m, n** *A. splendens* $2n = 32$; arrows in **m** mark faint CMA+ signals; **o, p, q, r** *A. umbelliformis* $2n = 34$; note 8 and 6 rDNA loci in pictures **p** and **r**, respectively; arrows in **q** indicate faint CMA+ signals



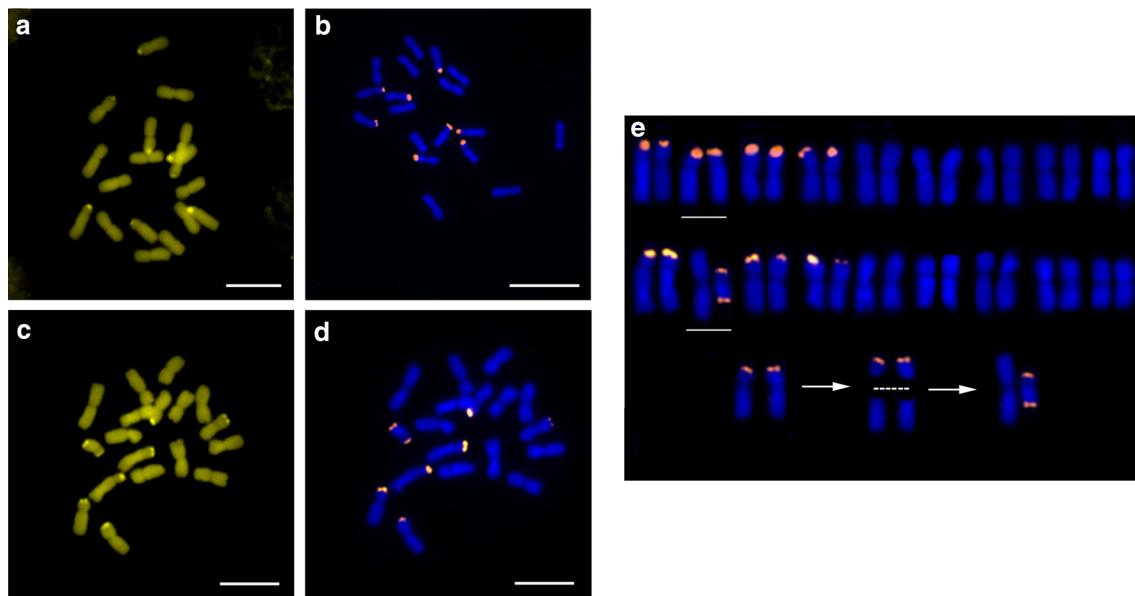


Fig. 4 Metaphases from *Artemisia eriantha*: regular metaphase (**a**, **b**) and metaphase with a likely Robertsonian translocation (**c**, **d**). Aligned chromosomes from **b** and **d** with the translocation pair underlined, and the possible mechanism of the translocation (**e**)

Table 2 Summary of the results (in number of signals) of the fluorochrome banding with chromomycin (CMA+) and of the fluorescent in situ hybridisation of rDNA

Species	Chromosome number	CMA+	rDNA
<i>A. melanolepis</i>	$2n = 2x = 16$	5 and 6	4
<i>A. glacialis</i> (Col de Tortisse)	$2n = 2x = 16$	20	4
<i>A. assoana</i>	$2n = 2x = 16$	18	6
<i>A. eriantha</i> (Urdiceto)	$2n = 2x = 18$	4	6
<i>A. eriantha</i> (Col du Lautaret)	$2n = 2x = 18$	8	8
<i>A. genipi</i>	$2n = 2x = 18$	4	4
<i>A. splendens</i>	$2n = 4x = 32$	8	8
<i>A. umbelliformis</i> (Noucreus)	$2n = 4x = 34$	6	6 and 8
<i>A. nitida</i>	$2n = 6x = 54$	c. 50	9

The position of signals is always terminal, except for CMA+ bands in *A. glacialis* and *A. assoana*, where most sites are pericentromeric. All taxa are high mountain species with the exception of *A. assoana*

nitida (Fig. 4j). Besides, a detached rDNA site is observed in *A. glacialis* (Fig. 3h).

Reconstruction of ancestral characters

The reconstruction of ancestral holoploid genome size onto the phylogeny (Fig. 2), based on diploid taxa, infers a holoploid genome size between 6.92 pg and 8.13 pg as the likely ancestral estimates both for the genus and for the HMA clade, in which ups and downs with respect to their putative common ancestors have occurred during the evolution of the genus. There has been an increase in the number of rDNA sites in 14 cases (45.16 %, three of them within the HMA clade, two within the high mountain) and a decrease in

only two cases (6.45 %); the remaining 15 (48.39 %) retain the alleged ancestral number of signals.

Discussion

Intraspecific genome size variation

Research on genome size variation within the species level has a long tradition, from the first reports in flax (Evans et al. 1966). Nevertheless, the extent of true intraspecific variation is still a source of debate. Critical reassessments of such variations have proved them to be artefacts in some cases, having identified technical problems, methodological errors

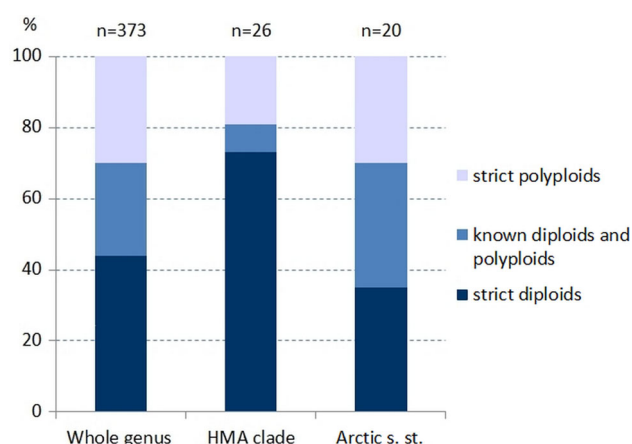


Fig. 5 Distribution of ploidy levels among different *Artemisia* groups. Data for the whole genus are taken from Vallès et al. (2011). Arctic *s. str.* species are selected from Tkach et al. (2008) and chromosome numbers are extracted from the index to chromosome numbers in Asteraceae. “n” indicates sample size

or presence of endogenous staining inhibitors as likely causes (Greilhuber 2005). However, many well-documented examples, based on accurate assessments, do suggest the existence of genuine intraspecific variation in nuclear DNA content (e.g. Suda et al. 2007; Trávníček et al. 2013).

With regards to the high mountain *Artemisia*, intraspecific genome size variation has been evaluated in *A. eriantha* (11.26 %) and *A. umbelliformis* (8.39 %), the most widely distributed species through the European mountains. The percentages here reported reflect a certain degree of variation, and interpopulational differences are significant in some cases in both species. Other studies on intraspecific variation across a distribution range performed in *Artemisia* have detected similar percentages: 8.8 % for 17 populations in the diploid *A. arborescens* (Garcia et al. 2006) and 9.22 % for 45 populations in the hexaploid *A. crithmifolia* (Pellicer et al. 2009). Yet it is difficult to set a cut-off point from which a given percentage of variation should be considered important. Intraspecific genome size variations have been related to microevolutionary differentiations and could be taxonomically significant, especially if there is some degree of morphological or ecological differentiation (Murray 2005). Neither *A. eriantha* nor *A. umbelliformis* show a clear morphological, geographical or ecological pattern to correlate with this variation; however, the detected differences are probably genuine. Possible sources of true intraspecific genome size variation that could explain the detected differences include the presence of aneuploidy or B-chromosomes, introgression or hybridisation processes (Morgan-Richards et al. 2004) or changes in repetitive DNA content (Trávníček et al. 2013).

Polyploidy is associated with genome downsizing and loci loss, but not necessarily with loss of GC-rich heterochromatin

Most studies have found genome downsizing on polyploids in multiple occasions, as it is the case with the alpine *Artemisia*. Recently, Meudt et al. (2015) found not only significant genome downsizing across *Veronica* but also a link with the diversification success of polyploid lineages. However, in some cases as in *Nicotiana* (Leitch et al. 2008, Renny-Byfield et al. 2011), despite the most common response to polyploidy is still genome downsizing, unchanged genome sizes and even genome upsizing have also been found linked to polyploidy processes in certain species.

Besides, the loci loss detected in these high mountain polyploids fits well with previous findings, particularly at the highest ploidies. Globally, most diploid *Artemisia* have four rDNA sites (58 %) while some have six (26 %), eight (13 %), and only in two cases nine and ten sites (<http://www.plantrdnadatabase.com>, accessed March 20th 2015). Regarding tetraploids, *Artemisia* species mostly show eight sites, consistent with our new findings for *A. splendens* and one population of *A. umbelliformis*. As with genome downsizing, loci loss is commonly observed across ploidy levels and seems to be a global response to polyploidy, however, others have found directly proportional increase (Bareka et al. 2012) or even loci gain (Hasterok et al. 2006). Factors such as qualitative and quantitative differences in transposable element (TE) composition of genomes, possible hybrid origins, and the amount of time elapsed after the polyploidisation event, may play a role on the extent of genome size loss after polyploidisation.

The amplification of certain GC-rich repetitive DNA families specific to certain species could explain the differential pattern observed in those species showing considerably more CMA+ signals, such as *A. nitida*. A similar finding was reported for the tetraploid *A. argilosa* (Garcia et al. 2007) and more recently, Olanj et al. (2015) found a striking number of CMA+ signals in *Tanacetum*, a genus closely related to *Artemisia* (reaching up to 66 at the diploid level, $2n = 18$). The observed abundance of pericentromeric CMA+ signals in certain species (*A. glacialis* and *A. assoana*) while most are (sub)terminal, would also point to other kinds of repetitive GC-rich DNA amplifying differently in these taxa. Contrasting to genome downsizing and loss of rDNA loci, there is no clear pattern with respect to the pattern of change of CMA+ bands with increasing ploidy: a given species can have very different profiles, and in some cases tetraploids have less CMA+ bands than diploids. As shown previously (Garcia et al. 2007, Olanj

et al. 2015), the underpinning evolutionary dynamics of GC-rich DNA is particularly elusive.

Reconstruction of ancestral characters and *Artemisia* cytogenetic features

Studies that address the evolution of cytogenetic traits considering a phylogenetic and temporal perspective are not common and there is no clear pattern in the direction of their changes (Leitch et al. 2008). During *Artemisia*'s evolution, both genome size and number of rDNA loci have undergone ups and downs, as others have previously found (Burleigh et al. 2012), this showing the dynamic nature of plant genomes. The ancestral-like condition of four rDNA sites in *Artemisia* is consistent with the most frequently found numbers of rDNA sites in angiosperms (<http://www.plantrdnadatabase.com>). The (sub) terminal position is also the most common, both in *Artemisia* and in angiosperms as a whole, consistently with evolutionary constraints favouring the terminal position for rDNA (Roa and Guerra 2012). Holoploid genome size has mostly remained stable or increased during *Artemisia*'s evolution: the reconstruction of ancestral holoploid genome size onto the phylogeny (Fig. 2) infers a value between 6.92 and 8.13 as the likely ancestral estimates both for the genus and for the HMA clade. This is considered intermediate ($7 \leq 2C < 28$ pg) according to the genome size categories of plants (Leitch et al. 2005). In angiosperms, the ancestral genome size has been reconstructed as very small ($2C \leq 2.8$ pg) with several independent increases and decreases taking place (Bennett and Leitch 2005).

Low incidence of polyploid taxa in the high mountain *Artemisia*

Polyploidy in the HMA clade is not particularly abundant when compared to the whole genus. In *Artemisia*, 44 % of species are only diploid, 30 % only exclusively polyploid, while 26 % are known both at diploid and polyploid levels (Vallès et al. 2011). However, in the HMA clade, while 73.08 % are only diploid, 19.23 % are exclusively polyploid and 7.69 % are known both at diploid and polyploid levels (Fig. 5). Other few high mountain species not belonging to this clade are also diploid, such as *A. atrata*. Nie et al. (2005) only detected 22 % of polyploid taxa across the flora of the Hengduan Mountains (Qing-Hai Tibet Plateau). More recently, Loureiro et al. (2013) found 23 % of polyploids across two Spanish high mountain ranges, showing that polyploidisation is probably not essential in determining species adaptation to such environments. Conversely, Löve and Löve (1967) and Morton (1993) found a high rate of polyploids in the alpine zone of Mt. Washington and in the Cameroon Mountains, respectively. Likewise, Vamosi and

McEwen (2013) detected an increase of polyploids in high elevations of British Columbia. However, it has been suggested that a high genome size (product of polyploidisation) would not be selected in alpine environments, in principle (Baack 2004). This could have promoted a lower frequency of alpine polyploids in medium-large holoploid genome size genera such as *Artemisia*. Interestingly, as Tkach et al. (2008) pointed out, we confirmed a higher frequency of polyploids in arctic *Artemisia* species (Fig. 5). This suggests that polyploidy ranges, and their increase with latitude, could be more related with their ability to colonise new habitats, such as newly deglaciated environments (Brochmann et al. 2004), rather than with a greater cold-hardiness or higher altitudes (Stebbins 1971; te Beest et al. 2012).

Descending dysploidy by recurrent Robertsonian translocations

A pioneer study by Kawatani and Ohno (1964) suggested descending dysploidy in *Artemisia* on the grounds of the much larger proportion of $x = 9$ -based taxa. Dysploidy has contributed to species differentiation in many genera, occurring once or repeatedly (Blösch et al. 2009; Schneeweiss et al. 2013). As pointed out previously, within the HMA clade there is a significant number of $x = 8$ (dysploid) species (12 out of 26 species) in a mostly $x = 9$ based genus, tribe and family (Schweizer and Ehrendorfer 1983). Within *Artemisia*, $x = 8$ -based species are around 14 % of the total whose chromosome number is known (Vallès et al. 2011). Yet in the HMA clade this grows to 46 %. Our ancestral state reconstruction points to the fact that $x = 9$ is the ancestral condition in the genus, as in family Asteraceae, although Semple and Watanabe (2009) hypothesised $x = 10$ was the ancestral base number in tribe *Anthemideae* (to which *Artemisia* belongs). This would support a hypothesis of downwards dysploidy within the tribe. Descending dysploidy has been related to plants adapted to extreme habitats in some Asteraceae genera (Garnatje et al. 2004) and this might be linked to $x = 8$ being over-represented in the HMA clade.

Few works have shown in detail the specific process leading to a decrease in basic chromosome number. However, a likely case of Robertsonian (Rb) translocation that could account for the descending dysploidy has been found in *A. eriantha* (Fig. 4). In fact, similar processes had already been suggested for *Artemisia* on the basis of observed centromeric fragility in a large chromosome pair (Vallès and Siljak-Yakovlev 1997). Likewise, a Rb translocation could have been involved in the appearance of $x = 17$ in species such as *A. umbelliformis*. Given the distribution of $x = 8$ taxa across *Artemisia*'s phylogeny, Rb translocations may have occurred independently several times in the genus (notwithstanding any other mechanisms promoting

descending dysploidy). It is possible, however, that the chromosomes involved in the translocation are not the same in all instances where $x = 8$ appears (i.e. different translocations affecting different chromosomes). We hypothesise that this may be the case in *Artemisia* since, (1) a notably larger chromosome pair is seen in several $x = 8$ species from the HMA clade (Fig. 4, e, f, g, h, k, l, arrows) while this is rarely observed in the other $x = 8$ species outside this clade and (2) holoploid genome size of $x = 8$ species from the HMA clade is significantly higher than that of the other $x = 8$ species outside this clade (Supplementary Material S3) which could be related to their specific translocation process (involving different chromosomes, which would explain the observed size differences, and perhaps different genomic processes which somehow could be related with the genome size differences detected). Therefore, the fact that only species from the HMA clade share these features (i.e. large chromosome pair and increased genome size) indicates that the event leading to $x = 8$ in this group would be common and may differ from other emergences of the dysploid karyotype in other groups, leading to size differences in the translocation chromosomes and genome size accumulation.

Conclusions

This work shows that *Artemisia* species from high mountain habitats do not present, at first sight, particular karyological features as compared with other alpine plant groups or other non-high mountain *Artemisia*. However, we do detect a high frequency of dysploids in the clade containing alpine *Artemisia*. Besides, polyploids are remarkably less abundant in the high mountains than in the rest of the genus. Thus, it seems that evolutionary processes in high mountain *Artemisia* have been less influenced by polyploidy and more affected by dysploidy and other mechanisms involving genome size increase, such as, for example, mobilisation of transposable elements or amplification of repetitive DNA, which still remain to be proved in these taxa. As previously reported for high mountain species from genus *Phyteuma* (Schneeweiss et al. 2013), descending dysploidy could be associated with lineage diversification in alpine *Artemisia*.

Acknowledgments This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad from the Government of Spain (CGL2010-22234-C02-01,02/BOS and CGL2013-49097-C2-2-P), the Generalitat de Catalunya, government of Catalonia (“Ajuts a grups de recerca consolidats”, 2009SGR0439 and 2014SGR514) and the IRBIO (Institut de Recerca de la Biodiversitat). GMdX benefited from an ADR grant from Universitat de Barcelona and SG from a Juan de la Cierva postdoctoral contract of the Ministerio de Economía y Competitividad from the Government of Spain. We thank Cristina Roquet, María Sanz and Roser Vilatersana for their help in collecting plant material. Ricard Àlvarez, Jaume Comas, Chari González and Sonia Ruiz are

thanked for their assistance in flow cytometric analyses, and Spencer Brown for supplying seeds of the internal standards used. We also thank Odile Robin with technical assistance at FISH slide preparation, Samuel Pyke for English proofreading and three anonymous reviewers for their helpful comments on earlier versions of the manuscript.

References

- Akaike H (1979) A Bayesian extension of the minimum AIC procedure of autoregressive model fitting. *Biometrika* 66:237–242
- Albach DC, Greilhuber J (2004) Genome size variation and evolution in *Veronica*. *Ann Bot* 94:897–911
- Baack EJ (2004) Cytotype segregation on regional and microgeographic scales in snow buttercups (*Ranunculus adoneus*: Ranunculaceae). *Am J Bot* 91:1783–1788
- Bareka P, Siljak-Yakovlev S, Kamari G (2012) Molecular cytogenetics of *Bellevia* (Hyacinthaceae) species occurring in Greece. *Plant Syst Evol* 298:421–430
- Bennett MD, Leitch IJ (2005) Nuclear DNA amounts in angiosperms—progress, problems and prospects. *Ann Bot* 95:45–90
- Blösch C, Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM, Barfussa MHJ, Rebernig CA, Villaseñor JC, Stuessy TF (2009) Molecular phylogenetic analyses of nuclear and plastid DNA sequences support dysploid and polyploid chromosome number changes and reticulate evolution in the diversification of *Melampodium* (Milleriaceae, Asteraceae). *Mol Phylogenet Evol* 53:220–233
- Brochmann C, Brytting A, Alsos IG, Borgen L, Grundt HH, Scheen AC, Elven R (2004) Polyploidy in arctic plants. *Biol J Linn Soc* 82:521–536
- Burleigh JG, Barbazuk WB, Davis JM, Morse AM, Soltis PS (2012) Exploring diversification and genome size evolution in extant gymnosperms through phylogenetic synthesis. *J Bot*
- Canestrelli D, Nascetti G (2008) Phylogeography of the pool frog *Rana (Pelophylax) lessonae* in the Italian peninsula and Sicily: multiple refugia, glacial expansions and nuclear–mitochondrial discordance. *J Biogeogr* 35:1923–1936
- Darriba D, Taboada G, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772
- Doležel J, Binarova P, Lucretti S (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol Plant* 31:113–120
- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytom Part A* 51:127–128
- Evans GM, Durrant A, Rees H (1966) Associated nuclear changes in the induction of flax genotrophs. *Nature* 212:697–699
- García S, Sanz M, Garnatje T, Kreitschitz A, McArthur ED, Vallès J (2004) Variation of DNA amount in 47 populations of the subtribe *Artemisiinae* and related taxa (Asteraceae, Anthemideae): karyological, ecological, and systematic implications. *Genome* 47:1004–1014
- García S, Garnatje T, Twibell JD, Vallès J (2006) Genome size variation in the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and its cultivars. *Genome* 49:244–253
- García S, Garnatje T, Hidalgo O, McArthur DE, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2007) Extensive ribosomal DNA (18S–5.8S–26S and 5S) colocalisation in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Plant Syst Evol* 267:79–92
- Garnatje T, Vallès J, Vilatersana R, García-Jacas N, Susanna A, Siljak-Yakovlev S (2004) Molecular cytogenetics of

- Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). Plant Biol (Stuttgart) 6:140–146
- Geber G, Schweizer D (1987) Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. Plant Syst Evol 158:97–106
- Gerlach W, Bedbrook J (1979) Cloning and characterisation of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic Acids Res 7:1869–1885
- Gerlach W, Dyer T (1980) Sequence organisation of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. Nucleic Acids Res 8:4851–4865
- Greilhuber J (2005) Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. Ann Bot 95:91–98
- Greilhuber J, Leitch IJ (2013) Genome size and the phenotype. In: Greilhuber J, Doležal J, Wendel JF (eds) Plant Genome Diversity, vol 2. Springer, Vienna, pp 323–344
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 41:95–98
- Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kowalczyk M, Kulak-Ksiazczyk S, Ksiazczyk T, Hensen WK, Maluszynska J (2006) Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. Ann Bot 97:205–216
- Kawatani T, Ohno T (1964) Chromosome numbers in *Artemisia*. Bull Natl Inst Hyg Sci 82:183–193
- Leitch IJ, Soltis DE, Soltis PS, Bennett MD (2005) Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). Ann Bot 95:207–217
- Leitch IJ, Hanson L, Lim KY, Kovarik A, Chase MW, Clarkson JJ, Leitch AR (2008) The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). Ann Bot 101:805–814
- Levin DA (2002) The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press, New York
- Ling YR, Humphries CJ, Shultz L, Flora of China Editorial Committee (2006) The genus *Artemisia* L. Flora China 20:1151–1259
- Loureiro J, Castro M, Cerca de Oliveira J, Mota L, Torices R (2013) Genome size variation and polyploidy incidence in the alpine flora from Spain. Anales Jard Bot Madrid 70:39–47
- Löve Á, Löve D (1949) The geobotanical significance of polyploidy. I. Polyploidy and latitude. Port Acta Biol Ser A 273–352
- Löve Á, Löve D (1967) Polyploidy and altitude: Mt. Washington. Biol Zentralbl Suppl 307–312
- Maddison W, Maddison D (2015) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>
- Marie D, Brown SC (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. Biol Cell 78:41–51
- Mas de Xaxars G, García-Fernández A, Barnola P, Martín J, Mercadé A, Vallès J, Vargas P, Vigo J, Garnatje T (2015) Phylogenetic and cytogenetic studies reveal hybrid speciation in *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* (Saxifragaceae). J Syst Evol 53:53–65
- Meudt HM, Rojas-Andrés BM, Prebble JM, Low E, Garnock-Jones PJ, Albach DC (2015) Is genome downsizing associated with diversification in polyploid lineages of *Veronica*? Bot J Linn Soc 178:243–266
- Morgan-Richards M, Treweek SA, Chapman HM, Krahulcová A (2004) Interspecific hybridization among *Hieracium* species in New Zealand: evidence from flow cytometry. Heredity 93:34–42
- Morton J (1993) Chromosome numbers and polyploidy in the flora of Cameroons Mountain. Op Bot 121:159–172
- Mráz P, Chrtěk J, Šingliarová B (2009) Geographical parthenogenesis, genome size variation and pollen production in the arctic-alpine species *Hieracium alpinum*. Bot Helv 119:41–51
- Murray BG (2005) When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? Ann Bot 95:119–125
- Nagy L, Grabherr G (2009) The biology of alpine habitats. Oxford University Press, New York
- Nie Z, Wen J, Gu Z, Boufford DE, Sun H (2005) Polyploidy in the flora of the Hengduan Mountains hotspot, southwestern China. Ann Missouri Bot Gard 92:275–306
- Nieto Feliner G (2011) Southern European glacial refugia: a tale of tales. Taxon 60:365–372
- Nieto Feliner G (2014) Patterns and processes in plant phylogeography in the Mediterranean Basin. A review. Perspect Plant Ecol 16:265–278
- Olanj N, Garnatje T, Sonboli A, Vallès J, Garcia S (2015) The striking and unexpected cytogenetic diversity of genus *Tanacetum* L. (Asteraceae): a cytometric and fluorescent in situ hybridisation study of Iranian taxa. BMC Plant Biol 15:174
- Pellicer J, Garcia S, Garnatje T, Vallès J (2009) Changes in genome size in a fragmented distribution area: the case of *Artemisia crithmifolia* L. (Asteraceae, Anthemideae). Caryologia 62:152–160
- Petit C, Thompson JD (1999) Species diversity and ecological range in relation to ploidy level in the flora of the Pyrenees. Evol Ecol 13:45–65
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D and R Core Team (2015) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-121. <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Renny-Byfield S, Chester M, Kovařík A, Le Comber SC, Grandbastien MA, Deloger M, Nichols RA, Macas J, Novák J, Chase MW, Leitch AR (2011) Next generation sequencing reveals genome downsizing in allotetraploid *Nicotiana tabacum*, predominantly through the elimination of paternally derived repetitive DNAs. Mol Biol Evol msi112
- Roa F, Guerra M (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. BMC Evol Biol 12:225
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572–1574
- Russell A, Safer S, Weiss-Schneeweiss H, Temsch E, Stuppner H, Stuessy TF, Samuel R (2013) Chromosome counts and genome size of *Leontopodium* species (Asteraceae: Gnaphalieae) from south-western China. Bot J Linn Soc 171:627–636
- Sanz M, Vilatersana R, Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Susanna A, Schneeweiss GM, Vallès J (2008) Molecular phylogeny and evolution of floral characters of *Artemisia* and allies (Anthemideae, Asteraceae): evidence from nrDNA ETS and ITS sequences. Taxon 57:66–78
- Sanz M, Schneeweiss GM, Vilatersana R, Vallès J (2011) Temporal origins and diversification of *Artemisia* and allies (Anthemideae, Asteraceae). Collect Bot 30:7–15
- Sanz M, Schönswetter P, Vallès J, Schneeweiss GM, Vilatersana R (2014) Southern isolation and northern long-distance dispersal shaped the phylogeography of the widespread, but highly disjunct, European high mountain plant *Artemisia eriantha* (Asteraceae). Bot J Linn Soc 174:214–226
- Schneeweiss GM, Pachschröck C, Tribsch A, Schönswetter P, Barfuss MH, Esfeld K, Weiss-Schneeweiss H, Thiv M (2013) Molecular phylogenetic analyses identify Alpine differentiation and dysploid chromosome number changes as major forces for the evolution of the European endemic *Phyteuma* (Campanulaceae). Mol Phylogenet Evol 69:634–652
- Schweizer D, Ehrendorfer F (1983) Evolution of C-band patterns in Asteraceae-Anthemideae. Biol Zentralbl 102:637–655
- Semple J, Watanabe K (2009) A review of chromosome numbers in Asteraceae with hypotheses on chromosome base number evolution. In: Funk VA, Susanna A, Suetssy TF, Bayer RJ (eds) Systematics, evolution and biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, pp 61–72

- Španiel S, Marhold K, Passalacqua NG, Zozomová-Lihová J (2011) Intricate variation patterns in the diploid-polyploid complex of *Alyssum montanum*-*A. repens* (Brassicaceae) in the Apennine Peninsula: evidence for long-term persistence and diversification. *Am J Bot* 98:1887–1904
- Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, London
- Suda J, Weiss-Schneeweiss H, Tribsch A, Schneeweiss GM, Trávníček P, Schönswetter P (2007) Complex distribution patterns of di-, tetra-, and hexaploid cytotypes in the European high mountain plant *Senecio carniolicus* (Asteraceae). *Am J Bot* 94:1391–1401
- te Beest M, Le Roux JJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubešová M, Pyšek P (2012) The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Ann Bot* 109:19–45
- Tkach NV, Hoffmann MH, Röser M, Korobkov AA, von Hagen KB (2008) Parallel evolutionary patterns in multiple lineages of arctic *Artemisia* L. (Asteraceae). *Evolution* 62:184–198
- Torrell M, Vallès J (2001) Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44:231–238
- Trávníček P, Kirschner J, Chudáčková H, Rooks F, Štěpánek J (2013) Substantial genome size variation in *Taraxacum stenocephalum* (Asteraceae, Lactuceae). *Folia Geobot* 48:271–284
- Vaio M, Gardner A, Emshwiller E, Guerra M (2013) Molecular phylogeny and chromosome evolution among the creeping herbaceous *Oxalis* species of sections *Corniculatae* and *Ripariae* (Oxalidaceae). *Mol Phyl Evol* 68:199–211
- Vallès J, Siljak-Yakovlev S (1997) Cytogenetic studies in the genus *Artemisia* L. (Asteraceae): fluorochrome-banded karyotypes of five taxa, including the iberian endemic species *Artemisia barrelieri* Besser. *Can J Bot* 75(4):595–606
- Vallès J, Garcia S, Hidalgo O, Martín J, Pellicer J, Sanz M, Garnatje T (2011) Biology, genome evolution, biotechnological issues and research including applied perspectives in *Artemisia* (Asteraceae). *Adv Bot Res* 6:349–419
- Vamosi J, McEwen J (2013) Origin, elevation, and evolutionary success of hybrids and polyploids in British Columbia, Canada. *Botany* 91:182–188
- Weiss-Schneeweiss H, Emadzade K, Jang TS, Schneeweiss GM (2013) Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants. *Cytogenet Genome Res* 140:137–150
- Zhao HB, Chen FD, Chen SM, Wu GS, Guo WM (2010) Molecular phylogeny of *Chrysanthemum*, *Ajania* and its allies (Anthemideae, Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast trnL-F IGS sequences. *Plant Syst Evol* 284:153–169

Supplementary Material S1. List of DNA sequences used for phylogenetic analyses.

Genus	Specific epithet	Chrom num	Ploidy level	2C (pg)	SD	5S/35S	Locality	Herbarium
<i>Argyranthemum</i>	<i>frutescens</i>	18	2	14,41	0,04	4	Spain, Tenerife, Anaga, near Montaña Tafada hill	x
<i>Artemisia</i>	<i>absinthium</i>	18	2	8,67	0,11	4	Spain, Teruel	BCN12313
<i>Artemisia</i>	<i>anethifolia</i>	16	2	4,18	0,01	6	Russia, Republic of Buryatia, Selenge reaion, bottom of a dried lake	LE06-22
<i>Artemisia</i>	<i>anethoides</i>	16	2	3,29	0,02	6	Mongolia, Selenge aimag, Shaamar sum, Buureg Toolgoi hills	BCN23790
<i>Artemisia</i>	<i>annua</i>	18	2	3,5	0,09	4	Spain, Catalonia, Barcelonès, Montcada i Reixac, ruderal places	BCN12486
<i>Artemisia</i>	<i>argilosa</i>	36	4	15,77	0,65	10	Coalmont, Jackson Co, Colorado	SSLP (McArthur 3034)
<i>Artemisia</i>	<i>aschurbajewii</i>	36	4	10,36	0,29	x	Kazakhstan, Almatynskaya oblast, Northern Alatau mountains	BCN25606
<i>Artemisia</i>	<i>atrata</i>	18	2	7,5	0,12	x	Switzerland, Champex (United Kingdom Artemisia Collection)	NCCPG1995-42
<i>Artemisia</i>	<i>austriaca</i>	16	2	5,68	0,06	x	Armenia, Sevan, lake Sevan, waste fields	BCN11559
<i>Artemisia</i>	<i>barrelieri</i>	36	4	12,96	0,33	8	Spain, Valencian country, Baix Segura, Oriola, dry hills	BCN12561
<i>Artemisia</i>	<i>biennis</i>	18	2	6,5	0,03	2	Canada, Mississauga, University campus , road margin	BCN3330
<i>Artemisia</i>	<i>bigelovii</i>	36	4	15,32	0,09	8	Padre Canyon, Cocconino Co., Arizona	SSLP (McArthur 2869)
<i>Artemisia</i>	<i>blepharolepis</i>	18	2	9,98	0,06	2	Mongolia, Umnu (South) Gobi aimag, Bulgan sum, desert steppe.	BCN34490
<i>Artemisia</i>	<i>cana ssp. bolanderi</i>	18	2	9,01	0,09	6	EEUU, California, NW of Bridgeport, Mono Co.	SSLP (McArthur 3047)
<i>Artemisia</i>	<i>capillaris</i>	18	2	3,44	0,04	9	Japan, Tsukuba, Research Center for Medicinal Plan Resources (cult.)	BCN87322
<i>Artemisia</i>	<i>chamaemelifolia</i>	18	2	6,04	0,24	4	Andorra: Canillo, Vall de Riu	BCN13222
<i>Artemisia</i>	<i>changaica</i>	36	4	11,7	0,2	8	Mongolia, Arkhangai aimag, Khorgo-Terkh National Park	BCN34487
<i>Artemisia</i>	<i>commutata</i>	18	2	6,05	0,22	8	Mongolia, Selenge aimag, Shaamar sum	BCN71352
<i>Artemisia</i>	<i>dolosa</i>	18	2	4,2	0,08	8	Mongolia, Uvur Khangai aimag, Khujirt sum	BCN23805
<i>Artemisia</i>	<i>dracunculus</i>	18	2	5,94	0,1	4	Rusia, Chita oblast, Kyra raion, steppe with herbs and bushes	BC873226
<i>Artemisia</i>	<i>eriantha</i>	18	2	6,18	0,14	6, 8	Spain, Uridiceto	BCN s.n M-204 (seqs)
<i>Artemisia</i>	<i>feddei</i>	16	2	5,39	0,16	x	Russia, Primorie krai, Nadezhda raion, river Razdolna valley, Terekhovk	LE-Korobkov
<i>Artemisia</i>	<i>fragrans</i>	18	2	5,35	0,21	4	Armenia, Ashtarak: between Agarak and Byurakan	BCN13272
<i>Artemisia</i>	<i>frigida</i>	18	2	5,25	0,06	x	EEUU, Colorado, Almond, marge de carretera	BCN11568
<i>Artemisia</i>	<i>frigida</i>	36	4	9,41	0,14	x	Russia, Chta oblast, Kyr raion	LE-Korobkov 06-27
<i>Artemisia</i>	<i>genipi</i>	18	2	5,6	0,09	4	Italy, Scaletta	x
<i>Artemisia</i>	<i>giraldii</i>	18	2	6	0,4	4	Mongolia, Bulgan aimag, Khugunkhaan mountain	BCN23806
<i>Artemisia</i>	<i>glacialis</i>	16	2	8,52	0,15	4	Valmontey, Aosta valley, Italy	BCN 11566

<i>Artemisia</i>	<i>glauca</i>	18	2	5,75	0,04	8	Mongolia, Tuv aimag, Ulaan Baatar	BCN71353
<i>Artemisia</i>	<i>granatensis</i>	16	2	7,43	0,11	x	Spain, Sierra Nevada	BCN11565
<i>Artemisia</i>	<i>haussknechtii</i>	16	2	x	x	x	Iran, Hamada, Kabud Rahan, Aholiabad mountains	BCN11561
<i>Artemisia</i>	<i>herba-alba</i> ssp. <i>valentina</i>	18	2	6,57	0,14	4	Spain, Madrid, Aranjuez, near Ontígola lake, gypseous hills	BCN13384
<i>Artemisia</i>	<i>incana</i>	16	2	x	x	x	Armenia, Krasnoselk, north shores of lake Sevan	BCN13926
<i>Artemisia</i>	<i>judaica</i>	16	2	11,52	0,16	x	Egypt, Es Sina', dry stony soils in Wadi Sheik	BCN13936
<i>Artemisia</i>	<i>ledebouriana</i>	36	4	8,75	0,1	9	Russia, Buryat Republic, Pribaikal raion	BC873221
<i>Artemisia</i>	<i>leucodes</i>	18	2	15,39	0,43	8	Dgizak, Uzbekistan	BCN11631
<i>Artemisia</i>	<i>leucophylla</i>	16	2	5,5	0,08	x	Mongolia, Tuv aimag, Ust-Aldans	BCN23792
<i>Artemisia</i>	<i>littoricola</i>	36	4	8,73	0,19	8	Russia, Sakhalin Island, Krasnogorsk	LE00-05
<i>Artemisia</i>	<i>lucentica</i>	16	2	7,68	0,18	x	Spain, Valencian country, Baix Segura, Oriola, dry hills	BCN13952
<i>Artemisia</i>	<i>macrocephala</i>	18	2	5,04	0,03	6	Mongolia, Uvur-Khangai aimag, Arvaykheer city, ruderal in streets	BCN23801
<i>Artemisia</i>	<i>magellanica</i>	18	2	6,18	0,26	2	Argentina, N. Patagonia, Chubut Dept., Madero stream	BCN67989
<i>Artemisia</i>	<i>manshurica</i>	36	4	8,54	0,05	6	Russia, Primorskii krai, Muraviev-Amurskii peninsula	LE06-230
<i>Artemisia</i>	<i>melanolepis</i>	16	2	8,04	0,08	x	Iran, Elburz Mountains	x
<i>Artemisia</i>	<i>monostachya</i>	36	4	8,91	0,12	8	Mongolia, Arkhangai aimag, Ikh Tamir sum	BCN23808
<i>Artemisia</i>	<i>nitida</i>	54	6	18,4	0,14	9	Italy, Alpi Apuane	x
<i>Artemisia</i>	<i>palustris</i>	18	2	5,16	0,05	4	Mongolia, Uvur-Khangai aimag, Khotont sum, margins of cultivated fields in steppe area	BCN34847
<i>Artemisia</i>	<i>paradoxa</i>	16	2	8,81	0,19	x	Iran	Sonboli & Asadollahi, 1409 (MPH)
<i>Artemisia</i>	<i>pattersonii</i>	14	2	x	x	x	EEUU, Colorado, Boulder	x
<i>Artemisia</i>	<i>pedemontana</i>	16	2	7,97	0,11	x	Spain, Teruel	x
<i>Artemisia</i>	<i>princeps</i>	34	4	9,74	0,12	6	Japan, Higashi-Hiroshima, Kagamiyama, ruderal places	BCN11674 (BCF43922)
<i>Artemisia</i>	<i>pycnorhiza</i>	36	4	9,02	0,29	10	Russia, Tyva Republic, Tusmand raion, Asvali, rocky dry slopes	BC873223 (LE04-115)
<i>Artemisia</i>	<i>pygmaea</i>	18	2	11,14	0,19	6	Yuba Dam Road, Juab Co., Utah	SSLP (McArthur 2870)
<i>Artemisia</i>	<i>reptans</i>	16	2	6,35	0,56	?	Morroco, Safi	BCN 97855
<i>Artemisia</i>	<i>rigida</i>	18	2	8,23	0,13	8	Malheur Reservoir, Malheur Co., Oregon	SSLP (McArthur 2859)
<i>Artemisia</i>	<i>salsoloides</i>	18	2	11,4	0,04	4	Russia, Volgogradskaya oblast, Kumylissi	BC873220
<i>Artemisia</i>	<i>schmidtiana</i>	18	2	5,74	0,11	x	NCCPG <i>Artemisia</i> Collection xi.2006 J.D. Twibell	NCCPG
<i>Artemisia</i>	<i>scoparia</i>	16	2	3,54	0,05	10	Sultanuizdag Mountains, Karkalpakstan, Uzbekistan	BCN11628
<i>Artemisia</i>	<i>sericea</i>	90	10	24,32	0,32	16	Russia, Krasnoyarsk krai, near Krasnoyarsk	x

<i>Artemisia</i>	<i>sieversiana</i>	18	2	6,17	0,07	4	Khanatalap, Almaty districk, Kazakhstan	BCN11692
<i>Artemisia</i>	<i>sphaerocephala</i>	18	2	5,52	0,16	8	Mongolia, Bulgan aimag, Dahin Shellen sum	BCN34485
<i>Artemisia</i>	<i>splendens</i>	32	4	13,59	0,21	8	Iran, Kaleibar, Doughron Dagh mountains	BCN14180
<i>Artemisia</i>	<i>stolonifera</i>	36	4	10,53	0,08	4	Russia, Primorie krai, Khassan raion, road to Zarubino	LE-Korobkov
<i>Artemisia</i>	<i>sylvatica</i>	16	2	5,58	0,13	x	Russia, Primorie krai, Nadezhda raion, Razdolnaya river valley, Terekhovk	LE-Korobkov
<i>Artemisia</i>	<i>tournefortiana</i>	18	2	6,69	0,12	4	Spain, Madrid, Titulcia, ruderal bank or river Jarama	BCN14204
<i>Artemisia</i>	<i>tridentata</i> ssp. <i>tridentata</i>	18	2	8,24	0,25	6	EEUU, Utah, Salt Cave Hollow Road, Juab Co.	SSLP (McArthur 2871)
<i>Artemisia</i>	<i>tridentata</i> ssp. <i>xericensis</i>	36	4	16,24	0,13	12	EEUU, Idaho, Mann Creek Reservoir, Washington Co.	SSLP (McArthur 2858)
<i>Artemisia</i>	<i>tripartita</i> ssp. <i>rupicola</i>	18	2	8,68	0,19	6	EEUU, Wyoming, Pole Mountain, Albany Co.	SSLP (McArthur 3033)
<i>Artemisia</i>	<i>tripartita</i> ssp. <i>tripartita</i>	36	4	15,32	0,18	8	EEUU, Idaho, Dubois Sheep Station, Clark Co.	SSLP (McArthur 2845)
<i>Artemisia</i>	<i>umbelliformis</i>	34	4	12,41	0,34	6, 8	Spain, Catalonia, Noucreus	BCN15121
<i>Artemisia</i>	<i>verlotiorum</i>	48	6	12,54	0,21	x	Spain, Catalonia, Sant Celoni	BCN15200
<i>Artemisia</i>	<i>vulgaris</i>	16	2	6,08	0,13	4	France, Île de France: Paris, Bois de Boulogne	BCN15297
<i>Nipponanthemum</i>	<i>nipponicum</i>	18	2	11,87	0,17	2	Japan, Higashi-Hiroshima	BCN S-811
<i>Tanacetum</i>	<i>parthenium</i>	36	4	x	x	8	Spain, Catalonia (cultivated)	BCN25431

Genus	Specific epithet	ITS1	ITS2	ETS	Ref GS&Chrom num	Ref Sequences (ITS; ETS)	Ref FISH
<i>Argyranthemum</i>	<i>frutescens</i>	EF577287	EF577287	AF123543	Suda et al., 2003	Zhao et al., 2010; Linder et al., 2000	Abd El-Twab and Kondo, 2012
<i>Artemisia</i>	<i>absinthium</i>	AF045394	AF079946	DQ028850	Pellicer et al., 2010a	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008 (from Spain, Setcases)	Garcia et al., 2009b
<i>Artemisia</i>	<i>anethifolia</i>	LK391723	LK391723	LK391718	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>anethoides</i>	LK391724	LK391724	LK391719	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>annua</i>	AF045383	AF079935	DQ028879	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008	Torrell et al., 2003
<i>Artemisia</i>	<i>argilosa</i>	HQ019037	HQ019037	HQ018995	Garcia et al., 2008	Garcia et al., 2011	Garcia et al., 2007
<i>Artemisia</i>	<i>aschurbajewii</i>	AF504170	AF504143	DQ028838	Garcia et al., 2004	Vallès et al., 2003; Sanz et al., 2010	x
<i>Artemisia</i>	<i>atrata</i>	FJ642973	FJ643009	FJ642937	Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2010a	x
<i>Artemisia</i>	<i>austriaca</i>	AF504171	AF504144	DQ028844	Pellicer et al., 2010a	Vallès et al., 2003; Sanz et al., 2010	x
<i>Artemisia</i>	<i>barrelieri</i>	AF045410	AF079961	DQ028875	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999, Sanz et al. 2008	Torrell et al., 2003
<i>Artemisia</i>	<i>biennis</i>	GU902817	GU902829	GU902841	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2010b	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>bigelovii</i>	HQ019038	HQ019038	HQ018996	Garcia et al., 2008	Garcia et al., 2011	Garcia et al., 2009a
<i>Artemisia</i>	<i>blepharolepis</i>	LK391725	LK391725	LK391720	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2014

<i>Artemisia</i>	<i>cana</i> ssp. <i>bolanderi</i>	HQ019040	HQ019040	HQ018998	Garcia et al., 2008	Garcia et al., 2011	Garcia et al., 2007
<i>Artemisia</i>	<i>capillaris</i>	JF326535	JF326535	JF326591	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2011	Hoshi et al., 2006
<i>Artemisia</i>	<i>chamaemelifolia</i>	AF045388	AF079940	FJ642938	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999; Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2008
<i>Artemisia</i>	<i>changaica</i>	JF326537	JF326537	JF326593	Pellicer et al., 2007	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>commutata</i>	JF326538	JF326538	JF326594	Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>dolosa</i>	JF326543	JF326543	JF326599	Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>dracunculus</i>	JF326545	JF326545	JF326601	Pellicer et al., 2007	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>eriantha</i>	DQ028919	DQ028906	DQ028842	New	Sanz et al., 2008	New
<i>Artemisia</i>	<i>feddei</i>	FJ642977	FJ643013	FJ642941	Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2010a	x
<i>Artemisia</i>	<i>fragrans</i>	AF045406	AF079957	DQ028871	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999, Sanz et al. 2008	Torrell et al., 2003
<i>Artemisia</i>	<i>frigida</i>	AM398869	AM398869	AM397976	Garcia et al., 2004	Tkach et al., 2008	x
<i>Artemisia</i>	<i>frigida</i>	HQ019046	HQ019046	HQ019004	Pellicer et al., 2010a	Tkach et al., 2008	x
<i>Artemisia</i>	<i>genipi</i>	AY180186	AY180187	New	New	D'Andrea et al., 2003; New	New
<i>Artemisia</i>	<i>giraldii</i>	JF326549	JF326549	JF326605	Pellicer et al., 2007	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>glacialis</i>	DQ028921	DQ028908	DQ028840	Garcia et al., 2004	Sanz et al., 2008	New
<i>Artemisia</i>	<i>glauca</i>	JF326550	JF326550	JF326606	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>granatensis</i>	AF045397	AF079949	DQ028841	New	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008	x
<i>Artemisia</i>	<i>haussknechtii</i>	AF504173	AF504146	DQ028837	x	Vallès et al., 2003; Sanz et al., 2009	x
<i>Artemisia</i>	<i>herba-alba</i> ssp. <i>valentina</i>	AF045403	AF079954	DQ028874	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008	Torrell et al., 2003
<i>Artemisia</i>	<i>incana</i>	AF504174	AF504147	DQ028839	x	Vallès et al., 2003; Sanz et al., 2010	x
<i>Artemisia</i>	<i>judaica</i>	AF504175	AF504148	DQ028848	Torrell and Vallès, 2001	Vallès et al., 2003; Sanz et al., 2008	x
<i>Artemisia</i>	<i>ledebouriana</i>	JF326560	JF326560	JF326616	Pellicer et al., 2007	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>leucodes</i>	AF504176	AF504149	DQ028893	Garcia et al., 2004	Vallès et al., 2003; Sanz et al., 2008	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>leucophylla</i>	JN861854	JN861940	AM397995	Pellicer et al., 2010a	Riggins and Seigler, 2012; Tkach et al., 2008	x
<i>Artemisia</i>	<i>littoricola</i>	JF326562	JF326562	JF326618	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>lucentica</i>	AF045390	AF079943	DQ028846	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008	x
<i>Artemisia</i>	<i>macrocephala</i>	LK391727	LK391727	LK391722	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>magellanica</i>	GU902814	GU902826	GU902838	Pellicer et al., 2010b	Pellicer et al., 2010b	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>manshurica</i>	JF326564	JF326564	JF326620	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2011	Abd El-Twab and Kondo, 2012
<i>Artemisia</i>	<i>melanolepis</i>	JX051703	JX051703	JX069457	New	Hobbs and Baldwin, 2013 (from Gorgon, Iran)	New
<i>Artemisia</i>	<i>monostachya</i>	JF326566	JF326566	JF326623	Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013

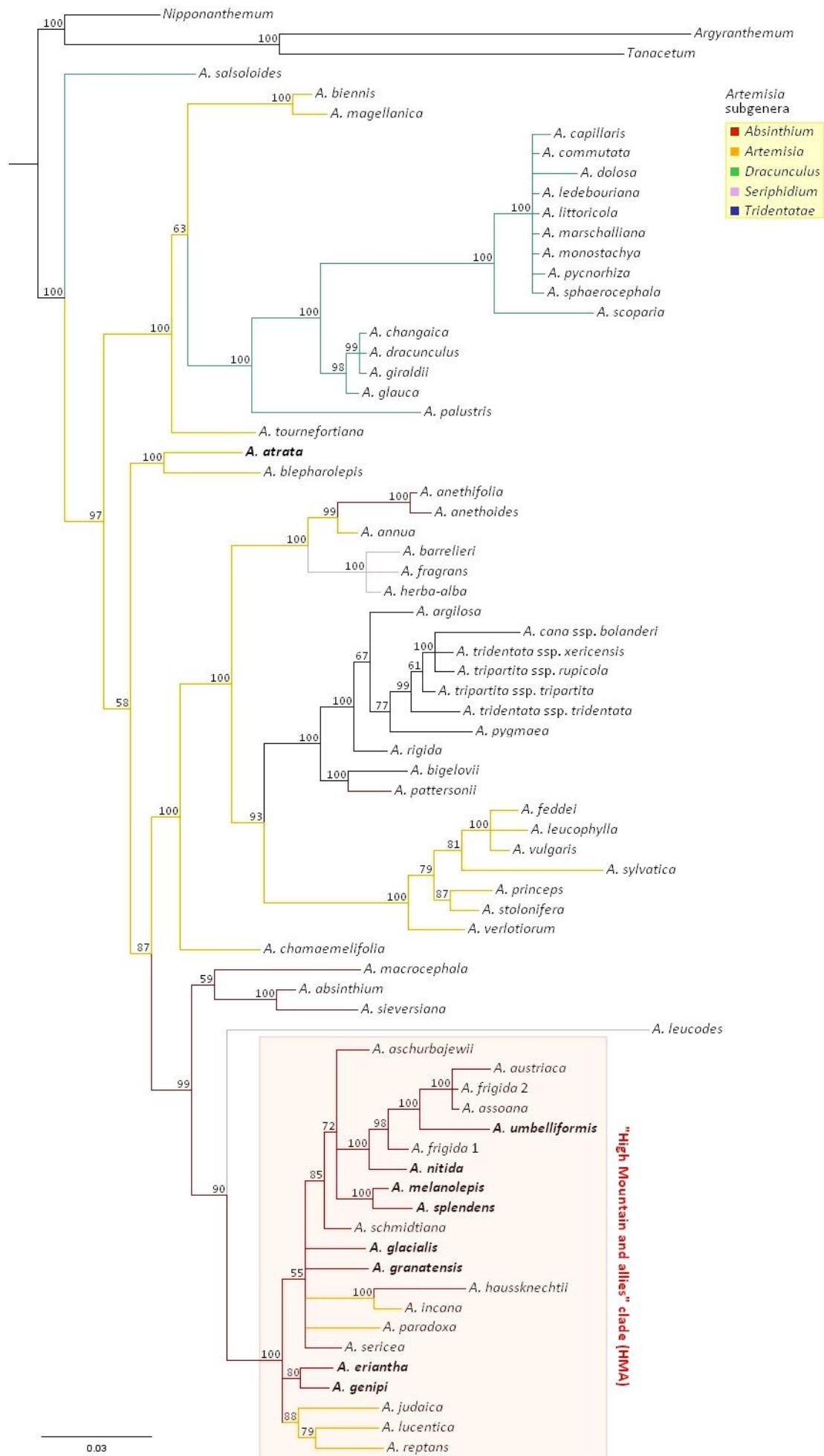
<i>Artemisia</i>	<i>nitida</i>	JX051698	JX051698	JX069398	New	Hobbs and Baldwin, 2013 (from Italy)	New
<i>Artemisia</i>	<i>palustris</i>	JF326570	JF326570	JF326627	Pellicer et al., 2014	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>paradoxa</i>	AB608335	AB608335	-	Sonboli et al., 2011	Sonboli et al., 2011	x
<i>Artemisia</i>	<i>pattersonii</i>	JX051737	JX051737	JX069425	x	Hobbs and Baldwin, 2013	x
<i>Artemisia</i>	<i>pedemontana</i>	JX051702	JX051702	JX069456	New	Hobbs and Baldwin, 2013 (from Spain, Teruel)	x
<i>Artemisia</i>	<i>princeps</i>	AF045386	AF079938	DQ028890	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008	Matoba and Uchiyama, 2009
<i>Artemisia</i>	<i>pycnorhiza</i>	JF326574	JF326574	JF326631	Pellicer et al., 2007	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>pygmaea</i>	HQ019055	HQ019055	HQ019013	Garcia et al., 2008	Garcia et al., 2011	Garcia et al., 2007
<i>Artemisia</i>	<i>reptans</i>	AF045391	AF079944	DQ028847	Garcia et al., 2013	Torell et al., 1999	x
<i>Artemisia</i>	<i>rigida</i>	HQ019056	HQ019056	HQ019014	Garcia et al., 2008	Garcia et al., 2011	Garcia et al., 2007
<i>Artemisia</i>	<i>salsoloides</i>	JF342550	JF342550	JF342553	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>schmidtiana</i>	FJ642996	FJ6433032	FJ642960	Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2010a	x
<i>Artemisia</i>	<i>scoparia</i>	JX445026	JX445044	JX445082	Garcia et al., 2004	Sarikhan et al., 2012	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>sericea</i>	AM398916	AM398916	AM398019	Pellicer et al., 2010a	Garcia et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>sieversiana</i>	AF504183	AF504156	DQ028851	Garcia et al., 2004	Vallès et al., 2003; Sanz et al., 2008	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>sphaerocephala</i>	JF326579	JF326579	JF326636	Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2011	Pellicer et al., 2013
<i>Artemisia</i>	<i>splendens</i>	AF045396	AF079948	DQ028845	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008	New
<i>Artemisia</i>	<i>stolonifera</i>	FJ643000	FJ643036	FJ642964	Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2010a	Hoshi et al., 2006
<i>Artemisia</i>	<i>sylvatica</i>	FJ643002	FJ643038	FJ642966	Pellicer et al., 2010a	Pellicer et al., 2010a	x
<i>Artemisia</i>	<i>tournefortiana</i>	AF045384	AF079936	DQ028853	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008	Pellicer et al., 2014
<i>Artemisia</i>	<i>tridentata</i> ssp. <i>tridentata</i>	HQ019060	HQ019060	HQ019018	Garcia et al., 2008	Garcia et al., 2011	Garcia et al., 2009a
<i>Artemisia</i>	<i>tridentata</i> ssp. <i>xericensis</i>	HQ019063	HQ019063	HQ019021	Garcia et al., 2008	Garcia et al., 2011	Garcia et al., 2009a
<i>Artemisia</i>	<i>tripartita</i> ssp. <i>rupicola</i>	HQ019064	HQ019064	HQ019022	Garcia et al., 2008	Garcia et al., 2011	Garcia et al., 2007
<i>Artemisia</i>	<i>tripartita</i> ssp. <i>tripartita</i>	HQ019065	HQ019065	HQ019023	Garcia et al., 2008	Garcia et al., 2011	Garcia et al., 2009a
<i>Artemisia</i>	<i>umbelliformis</i>	AF045395	AF079947	DQ028843	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008	New
<i>Artemisia</i>	<i>verlotiorum</i>	AF045387	AF079939	DQ028891	Garcia et al., 2013	Torrell et al., 1999	x
<i>Artemisia</i>	<i>vulgaris</i>	AF045385	AF079937	DQ028889	Torrell and Vallès, 2001	Torrell et al., 1999; Sanz et al., 2008	Pellicer et al., 2008
<i>Nipponanthemum</i>	<i>nipponicum</i>	DQ028926	DQ028913	DQ028834	Garcia et al., 2004	Sanz et al., 2008	x
<i>Tanacetum</i>	<i>parthenium</i>	AF504194	AF504167	DQ028833	x	Vallès et al., 2003; Sanz et al., 2008	Abd El-Twab and Kondo, 2012

x = no information; in red = sequences from a different locality than chromosome count, genome size assessment and FISH.

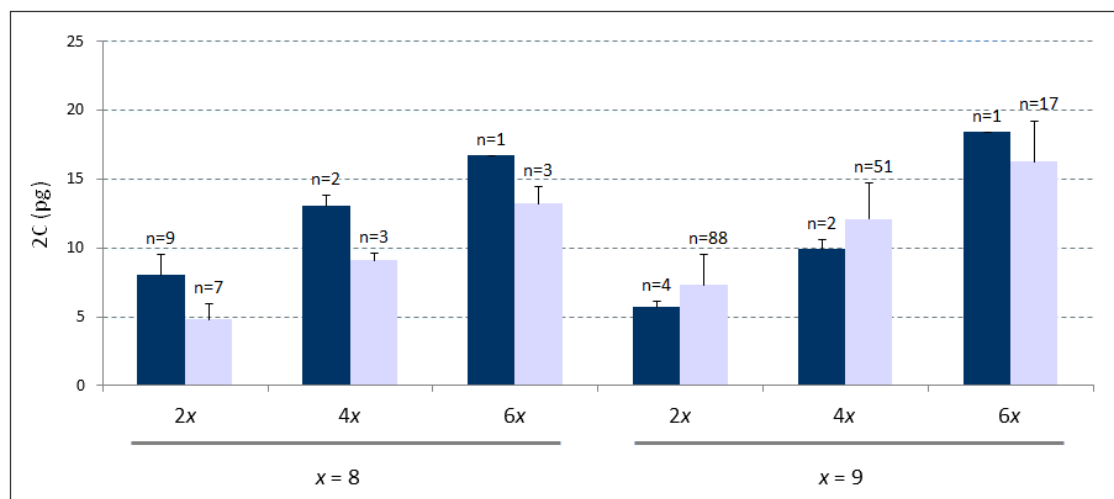
References from Supplementary Material S1

- Abd El-Twab MH, Kondo K (2012)** Physical mapping of 5S and 45S rDNA in *Chrysanthemum* and related genera of the Anthemideae by FISH, and species relationships. *J. Genet.* 91: 245-249.
- D'Andrea S, Caramiello R, Ghignone S, Siniscalco C (2003)** Systematic studies on some species of the genus *Artemisia*: biomolecular analysis. *Plant. Biosyst.* 137: 121-130.
- Garcia S, Sanz M, Garnatje T, Kreitschitz A, McArthur ED, Vallès J (2004)** Variation of DNA amount in 47 populations of the subtribe Artemisiinae and related taxa (Asteraceae, Anthemideae): karyological, ecological and systematic implications. *Genome* 47: 1004-14.
- Garcia S, Garnatje T, Hidalgo O, McArthur ED, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2007)** Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Plant. Syst. Evol.* 267: 79-92.
- Garcia S, Canela MA, Garnatje T, McArthur ED, Pellicer J, Sanderson SC, Vallès J (2008)** Evolutionary and ecological implications of genome size in the North American endemic sagebrushes and allies (*Artemisia*, Asteraceae). *Biol. J. Linn. Soc.* 94: 631-649.
- Garcia S, Garnatje T, Pellicer J, McArthur ED, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2009a)** Ribosomal DNA, heterochromatin and correlation with genome size in diploid and polyploid North American endemic sagebrushes (*Artemisia*, Asteraceae). *Genome* 52: 1012-1024.
- Garcia S, Lim KY, Chester M, Garnatje T, Pellicer J, Valles J, Leitch AR, Kovarik A (2009b)** Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma* 118: 85-97.
- Garcia S, Hidalgo O, Jakovljević I, Siljak-Yakovlev S, Vigo J, Garnatje T, Vallès J (2013)** New data on genome size in 128 Asteraceae species and subspecies, with first assessments for 40 genera, 3 tribes and 2 subfamilies. *Plant. Biosyst.* 147: 1219-1227.
- Hobbs CR, Baldwin BC (2013)** Asian origin and upslope migration of Hawaiian *Artemisia* (Compositae–Anthemideae) *J. Biogeogr.* 40:442–454.
- Linder CR, Goertzen LR, Vander Heuvel B, Francisco-Ortega J, Jansen RK (2000)** The external transcribed spacer of the rDNA repeat: a New nuclear region for low-level taxonomic analysis of the Asteraceae and closely allied families. *Mol. Phyl. Evol.* 14: 285-303.
- Matoba H, Uchiyama H (2009)** Physical mapping of 5S rDNA, 18S rDNA and telomere sequences in three species of the genus *Artemisia* (Asteraceae) with distinct basic chromosome numbers. *Cytologia* 74: 115-123.
- Pellicer J, Garcia S, Garnatje T, Dariimaa S, Korobkov AA, Vallès J (2007)** Chromosome numbers in some *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae) species and genome size variation in its subgenus *Dracunculus*: Karyological, systematic and phylogenetic implications. *Chromosome Bot.* 2: 45-53.
- Pellicer J, Garcia S, Garnatje T, Hidalgo O, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2008)** Molecular cytogenetic characterization of some representatives of the subgenera *Artemisia* and *Absinthium* (genus *Artemisia*, Asteraceae). *Collect. Bot.* 27: 13-21.
- Pellicer J, Garcia S, Canela MA, Garnatje T, Korobkov AA, Twibell JD, Vallès J (2010a)** Genome Size Dynamics in *Artemisia* L. (Asteraceae): Following the Track of Polyploidy. *Plant. Biol.* 12: 820-30.
- Pellicer J, Garnatje T, Molero J, Pustahija F, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2010b)** Origin and evolution of the South American endemic *Artemisia* species (Asteraceae): evidence from molecular phylogeny, ribosomal DNA and genome size data. *Aust. J. Bot.* 58: 605-616.

- Pellicer J, Garcia S, Vallès J, Kondo K, Garnatje T (2013)** FISH mapping of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* subgenus *Dracunculus* (Asteraceae): changes in number of loci during polyploid evolution and their systematics implications. *Bot. J. Linn. Soc.* 171: 655-666.
- Pellicer J, Hidalgo O, Garnatje T, Kondo K, Vallès J (2014)** Life cycle versus systematic placement: phylogenetic and cytogenetic studies in annual *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae). *Turk. J. Bot.* 38: 1112–1122.
- Riggins CW, Seigler DS (2012)** The genus *Artemisia* (Asteraceae: Anthemideae) at a continental crossroads: molecular insights into migrations, disjunctions, and reticulations among Old and New World species from a Beringian perspective. *Evolution* 64:471-490.
- Sanz M, Vilatersana R, Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Susanna A, Schneeweiss GM, Vallès J (2008)** Molecular phylogeny and evolution of floral characters of *Artemisia* and allies (Anthemideae, Asteraceae): evidence from nrDNA ETS and ITS sequences. *Taxon* 54: 66-78.
- Sarikhani S, Aryakia E, Azarbaijani R, Dolatyari A, Mousavi SH, Ramezani H, Parsa Yeganeh L, Shahzadeh Fazeli SA, Naghavi MR, Hosseini Salekdeh G (2012)** Molecular phylogenetic analysis of the genus *Artemisia* L. (Asteraceae) in Iran based on nrDNA ITS and ETS sequences. Unpublished.
- Sonboli A, Osaloo SK, Vallès J, Oberprieler C (2011)** Systematic status and phylogenetic relationships of the enigmatic *Tanacetum paradoxum* Bornm. (Asteraceae, Anthemideae): evidences from nrDNA ITS, micromorphological, and cytological data. *Plant. Syst. Evol.* 292:85-93.
- Suda J, Kyncl T & Freiov R (2003)** Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. *Ann. Bot.* 92: 153-164.
- Tkach NV, Hoffmann MH, Röser M, Korobkov AA, von Hagen KB (2008)** Parallel evolutionary patterns in multiple lineages of arctic *Artemisia* L. (Asteraceae). *Evolution* 62:184–98.
- Torrell M, Garcia-Jacas N, Susanna A, Vallès J (1999)** Phylogeny in *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae) inferred from nuclear ribosomal DNA (ITS) sequences. *Taxon* 48:721-736.
- Torrell M, Vallès J (2001)** Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44: 231-238.
- Torrell M, Cerbah M, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2003)** Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescence in situ hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant. Syst. Evol.* 239: 141-153.
- Vallès J, Torrell M, Garnatje T, Garcia-Jacas N, Vilatersana N, Susanna A (2003)** The genus *Artemisia* and its allies: phylogeny of the subtribe Artemisiinae (Asteraceae, Anthemideae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant. Biol.* 5:274–284.
- Zhao HB, Chen FD, Chen SM, Wu GS, Guo WM (2010)** Molecular phylogeny of *Chrysanthemum*, *Ajania* and its allies (Anthemideae, Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast trnL-F IGS sequences. *Plant. Syst. Evol.* 284: 153-169.



Supplementary Material S2. Phylogenetic tree using ITS1, ITS2 and 3'ETS rDNA sequences of *Artemisia*.



Supplementary Material S3. Dynamite plot on mean genome sizes of $x = 8$ and $x = 9$ based *Artemisia* species from the HMA clade (dark blue) and from the rest of the genus (light blue). “n” indicates sample size.

